

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la proteína DiiA de *Streptococcus pneumoniae* y
evaluación de su potencial como antígeno vacunal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María de la Soledad Escolano Martínez

Directores

José Enrique Yuste Lobo
Antonio Javier Martín Galiano

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la proteína DiiA de
Streptococcus pneumoniae
y evaluación de su potencial como
antígeno vacunal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

MARÍA DE LA SOLEDAD ESCOLANO MARTÍNEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES

José Enrique Yuste Lobo

Antonio Javier Martín Galiano

Centro Nacional de Microbiología

Instituto de Salud Carlos III

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la proteína DiiA de
Streptococcus pneumoniae
y evaluación de su potencial como
antígeno vacunal**

MARÍA DE LA SOLEDAD ESCOLANO MARTÍNEZ

Centro Nacional de Microbiología



Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II

**Caracterización de la proteína DiiA de
Streptococcus pneumoniae
y evaluación de su potencial como
antígeno vacunal**

**Tesis doctoral presentada por
María de la Soledad Escolano Martínez
para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid**

Directores:

**Dr. Jose Enrique Yuste Lobo
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III**

**Dr. Antonio Javier Martín Galiano
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III**

Madrid, 2017

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jose Enrique Yuste Lobo y al Dr. Antonio Javier Martin Galiano por la dirección de esta tesis doctoral.

A mis compañeros de laboratorio y a los integrantes de ambos laboratorios en los que he trabajado por su colaboración en la realización de esta tesis doctoral.

Y, finalmente, a mis padres y hermanos.

ABREVIATURAS

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>) y la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (<http://old.iupac.org/publications/epub/index.html#nt>), en esta Tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

aa, aminoácido(s).

ADN, ácido desoxirribonucleico.

aLf, apolactoferrina.

ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo o *American Type Culture Collection* (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>).

BSA, seroalbúmina bovina o *bovine serum albumin*.

C4BP, proteína de unión al factor C4b del complemento o *C4b-binding protein*.

CBP, proteína de unión a colina o *choline-binding protein*.

CC, complejos clonales.

CHL, cloranfenicol o *chloramphenicol*.

CIB, Centro de Investigaciones Biológicas.

Clg, colágeno.

CN, control negativo.

CnA, condroitín sulfato A.

CnB, condroitín sulfato B.

CNM, Centro Nacional de Microbiología.

CPS, polisacárido capsular/cápsula polisacáridica o *capsular polysaccharide*.

CSIC, Centro Superior de Investigaciones Científicas.

CSP, péptido estimulador de la competencia o *competence stimulator peptide*.

CRP, proteína C reactiva o *C-reactive protein*.

Cx, componentes.

DiiA, proteína dimórfica A implicada en invasión o *dimorphic invasion-involved protein A*.

DL₅₀, dosis letal 50.

DO, densidad óptica.

DS, desviación estándar.

DUF, dominio de función desconocida o *domain of unknown function*.

EA-EPOC, exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

EDTA, ácido etilendiaminetetraacético o *ethylenediaminetetraacetic acid*.

El, elastina.

EN, enfermedad neumocócica.

ENI, enfermedad neumocócica invasiva.

ENNI, enfermedad neumocócica no invasiva.

EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Fab, fracción variable de un anticuerpo.

Fc, fracción constante de un anticuerpo.

FH, factor H.

FITC, isotiocianato de fluoresceína.

Fn, fibronectina.

hLf, hololactoferrina.

HRP, *horseredish peroxidase*

IC, índice de competitividad.

Ig, inmunoglobulina.

IN, intranasal.
IP, intraperitoneal.
IPTG, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
IRF, índice relativo de fluorescencia.
IS, secuencia de inserción.
ISCIII, Instituto de Salud Carlos III.
KAN, kanamicina.
 K_D , constante de afinidad.
LB, medio de cultivo Luria-Bertani.
LBA, lavado broncoalveolar.
 L_B , linfocitos B.
Lf, lactoferrina.
Lm, laminina.
LNF, lavado nasofaríngeo.
LRMM, marcador de bajo peso molecular o *low range molecular marker*.
 L_T , linfocitos T.
Mc, mucina de glándula submaxilar.
MHC, complejo mayor de histocompatibilidad o *major histocompatibility complex*.
MLST, tipificación por secuenciación multilócica o *multilocus sequence typing*.
NA, no aplicable.
NAC, neumonía adquirida en la comunidad.
NS, no significativo.
nt, nucleótido(s).
OPD, orto-fenildiamina o *ortho-phenylenediamine*.
PAFR, receptor del factor activador de plaquetas o *platelet-activating factor receptor*.
PAMP, modelo molecular asociados a patógeno o *pathogen-associated molecular pattern*.
pb, pares de bases.
PCho, fosforilcolina o *phosphorylcholine*.
PCR, reacción en cadena de la polimerasa o *polymerase chain reaction*.
PCV, vacuna polisacáridica antineumocócica conjugada.
PCV7, vacuna polisacáridica antineumocócica conjugada 7-valente.
PCV10, vacuna polisacáridica antineumocócica conjugada 10-valente.
PCV13, vacuna polisacáridica antineumocócica conjugada 13-valente.
PE, ficoeritrina o *phycoerythrin*.
Pe, proteína externa.
PFA, paraformaldehído.
Pht, triada de polihistidina o *polyhistidine triad*.
pIgR, receptor polimérico de inmunoglobulinas o *polymeric immunoglobulin receptor*.
Pl, plasminógeno.
PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonio o *phenylmetilsulfonyl fluoride*.
PPV, vacuna polisacáridica antineumocócica o *pneumococcal polysaccharide vaccine*.
PPV23, vacuna polisacáridica antineumocócica 23-valente.
Pr, promotor.
PRL, proteína rica en leucina.
PRR, receptor de reconocimiento de patrones o *pattern-recognition receptor*.
 R , resistente.
RI, respuesta inmunitaria.
RIA, respuesta inmunitaria adquirida.
RII, respuesta inmunitaria innata.

IRF, índice relativo de fluorescencia.

RPMI, medio RPMI o *Roswell Park Memorial Institute* medium.

SDS, dodecilsulfato sódico o *sodiumdodecyl sulphate*.

SI, sistema inmunitario.

Si, secuencia de inserción.

SP, proteína de superficie o surface protein.

SPR, resonancia de plasmones de superficie o *surface plasmon resonance*.

ST, secuencitipos.

TAE, tampón para electroforesis de ADN en geles de agarosa. Contiene Tris-HCl 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM; pH 8.1.

TP, transportador.

TR, transposasa.

Tr, terminador.

THY, medio Todd-Hewitt conteniendo 0.5% de extracto de levadura.

UFC, unidades formadoras de colonias.

UR, unidades de resonancia.

ÍNDICE

RESUMEN	i-v
SUMMARY	vii-xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1. <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> ES UNO DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS EN HUMANOS	3
1.1. Características generales y aspectos históricos	3
1.2. Epidemiología de la enfermedad neumocócica	3
1.3. Factores de virulencia de <i>S. pneumoniae</i>	5
1.3.1. Cápsula polisacáridica	5
1.3.2. Proteínas de superficie	5
1.3.3. Neumolisina.....	12
1.4. Mecanismos de defensa del hospedador	13
1.4.1. Respuesta humoral.....	13
1.4.2. Respuesta celular	15
1.5. Patogénesis de la infección neumocócica.....	15
1.5.1. Estado de portador	15
1.5.2. Enfermedad neumocócica	16
2. MEDIDAS PROFILÁCTICAS FRENTE A LA INFECCIÓN NEUMOCÓCICA ...	18
2.1. Vacunología clásica y reversa.....	18
2.2. Vacunas actuales frente a <i>S. pneumoniae</i> : polisacáridica y conjugadas	19
2.3. Potenciales proteínas candidatas a vacuna	22
2.3.1. Neumolisina.....	24
2.3.2. Proteínas de unión a colina.....	24
2.3.3. Lipoproteínas.....	25
2.3.4. Proteínas LPxTG	25
2.3.6. Familia de proteínas Pht.....	25
2.4. Nuevas vacunas incluidas en ensayos clínicos	26
II. OBJETIVOS	29
III. MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	35
2. MEDIOS, CONDICIONES Y CONSERVACIÓN DE CULTIVOS	37
3. REACTIVOS, PRODUCTOS, ANTICUERPOS Y SUERO HUMANO	38

4. TÉCNICAS DE ADN	40
4.1. Extracción de ADN cromosómico	40
4.2. Reacción en cadena de la polimerasa	41
4.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	41
4.4. Manipulación del ADN con enzimas de uso común en biología molecular	42
4.5. Secuenciación de ADN	42
5. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES ISOGÉNICOS EN TIGR4.....	42
5.1. Construcción de mutantes en el gen <i>diiA</i>	42
5.2. Construcción de mutantes en el gen <i>pspA</i>	43
6. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i>	44
7. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS	44
7.1. Producción de las variantes recombinantes de la proteína DiiA	44
7.2. Purificación de las variantes recombinantes de la proteína DiiA	44
7.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida	46
7.4. Cromatografía de filtración en gel	46
7.5. <i>Western-blot</i>	46
7.6. Detección de la proteína DiiA	47
8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	47
8.1. Estudios de secuencia.....	47
8.2. Estudios genéticos.....	47
8.3. Estudios de arquitectura de dominios.....	48
8.4. Estudios de antigenicidad	49
9. ENSAYOS DE INTERACCIÓN CON DIFERENTES COMPONENTES DEL HOSPEDADOR.....	49
9.1. Resonancia de plasmones de superficie	49
9.2. Depósito del complemento en presencia y ausencia de lactoferrina.....	50
9.3. Interacción de neumococo con células de pulmón.....	51
10. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	51
10.1. Declaraciones éticas	51
10.2. Características de los ratones empleados.....	52
10.3. Modelo de colonización, neumonía bacteriémica y sepsis para estudios de patogenicidad	52
10.4. Determinación de la dosis letal mínima	53
10.5. Pautas de inmunización	54
10.6. Obtención de muestras de ratones inmunizados	54
10.7. Determinación de inmunoglobulinas	54
10.8. Activación del C3b inducida por anticuerpos frente a DiiA.....	55

10.9. Expresión de receptores CD-3, CD-4 y CD-8	55
10.10. Modelos de infección en ratones inmunizados	56
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
IV. RESULTADOS	59
1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA, GENÓMICA Y PROTÉICA DE DiiA	61
1.1. Estudio del gen <i>diiA</i>	61
1.2. Topología de dominios de la proteína DiiA	62
1.3. Expresión de DiiA en la superficie bacteriana.....	65
1.4. Comparación de los dominios de DiiA con proteínas similares en otros estreptococos	66
1.5. Especificidad de DiiA	67
2. RELEVANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LOS ALELOS DE DiiA	69
2.1. Distribución de las variantes alélicas en cepas clínicas	69
2.2. Asociación entre variante alélica y enfermedad neumocócica	69
3. IMPLICACIÓN DE DiiA EN LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA	72
3.1. Contribución de DiiA a la patogénesis por <i>S. pneumoniae</i>	72
3.1.1. Papel de DiiA en la colonización de la nasofaringe	73
3.1.2. Papel de DiiA en el proceso de neumonía invasiva.....	74
3.1.3. Papel de DiiA en sepsis.....	76
3.2. Unión de DiiA a biomoléculas del hospedador	77
3.3. Participación de DiiA en la evasión del sistema inmunitario	79
3.4. Interacción de <i>S. pneumoniae</i> con células del epitelio pulmonar mediada por DiiA	82
4. RESPUESTA INMUNOGÉNICA GENERADA POR DiiA	83
4.1. Predicción <i>in silico</i> de la inmunogenicidad de DiiA.....	83
4.2. Respuesta de inmunoglobulinas tras inmunización intraperitoneal.....	84
4.3. Funcionalidad de los anticuerpos generados tras inmunización intraperitoneal.....	86
4.4. Respuesta inmunitaria a nivel celular tras inmunización intraperitoneal.....	87
4.5. Respuesta de inmunoglobulinas tras inmunización intranasal	88
5. EVALUACIÓN DE LA INMUNOPROTECCIÓN CONFERIDA POR DiiA	89
5.1. Protección frente a sepsis por <i>S. pneumoniae</i> tras inmunización intraperitoneal	89
5.2. Protección frente a neumonía bacteriémica por <i>S. pneumoniae</i> tras inmunización intraperitoneal	92
5.3. Protección frente a neumonía bacteriémica por <i>S. pneumoniae</i> tras inmunización intranasal.....	93
5.4. Protección frente a colonización por <i>S. pneumoniae</i> tras inmunización intranasal	95

V. DISCUSIÓN	97
1. DiiA ES UNA ADHESINA ESPECÍFICA DE <i>S. PNEUMONIAE</i>	99
2. DiiA RECONOCE MOLÉCULAS DEL HOSPEDADOR QUE LA HACEN ESTAR IMPLICADA EN PROCESOS DE PATOGÉNESIS	103
3. DiiA COMO POTENCIAL ANTIGENO VACUNAL	111
VI. CONCLUSIONES	119
VII. BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXO	143

RESUMEN

Caracterización de la proteína DiiA de *Streptococcus pneumoniae* y evaluación de su potencial como antígeno vacunal.

INTRODUCCIÓN: *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) puede encontrarse en el hombre formando parte de la microbiota de la nasofaringe aunque también puede diseminarse produciendo enfermedades invasivas y no invasivas, principalmente en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013). Sin embargo, muchos aspectos de la patobiología de este microorganismo no se conocen en profundidad, concretamente la transición de comensal a patógeno. Aunque el principal factor de virulencia de neumococo es su cápsula polisacáridica (McDaniel y Swiatlo, 2004), las proteínas de superficie también tienen un papel fundamental en la patogénesis de la bacteria. Estas proteínas interaccionan directamente con el hospedador permitiendo, por ejemplo, la colonización de la nasofaringe, la internalización a través del epitelio pulmonar y la invasión de otros tejidos por parte de la bacteria (Kadioglu *et al.*, 2008).

Las proteínas de superficie que median la adhesión presentan típicamente una arquitectura que incluye un dominio de anclaje a la pared celular, un tallo desestructurado que se proyecta hacia el exterior y – en el extremo más distal – secuencias repetidas que suelen plegarse como láminas beta (Lin *et al.*, 2012). El número de repeticiones puede variar entre aislados clínicos, lo que puede condicionar tanto la afinidad por la molécula diana como la inmunogenicidad de la proteína (Gravekamp *et al.*, 1997).

Desde hace años se ha tratado de prevenir la infección por neumococo mediante vacunación de la población de riesgo (Grabenstein y Klugman, 2012). Aunque las vacunas comercializadas hasta la fecha están constituidas por los polisacáridos capsulares de los serotipos más infectivos, no protegen frente a todas las cepas y se hace necesario el desarrollo de vacunas proteicas universales serotipo-independientes (Feldman y Anderson *et al.*, 2014). En este sentido, la vacunología reversa se presenta como una herramienta muy valiosa a la hora de estudiar nuevas proteínas de superficie implicadas en virulencia y con carácter inmunoprotector (Sette *et al.*, 2010). Para ello se realizan análisis genómicos y otras tecnologías de alto rendimiento de patógenos humanos primarios (Seib *et al.*, 2012) (Monterrubio-López *et al.*, 2015). Las proteínas que constituyan una nueva vacuna deberían presentar idealmente las siguientes

características: estar expuestas al exterior; ser capaces de producir una respuesta inmunológica completa en el hospedador; presentar variabilidad alélica limitada; estar presente en el mayor número posible de aislados clínicos; y estar implicada en virulencia en uno o más estadios de la infección (Schulz y Hammerschmidt, 2013).

OBJETIVOS:

1. Analizar las características genéticas, genómicas y proteicas esenciales de la proteína DiiA de *S. pneumoniae*.
2. Estudiar la relación entre la variabilidad alélica de DiiA y el perfil epidemiológico de *S. pneumoniae*.
3. Justificar la relevancia de DiiA en la enfermedad neumocócica utilizando modelos murinos y abordajes *in vitro*.
4. Caracterizar la respuesta inmunogénica inducida por DiiA.
5. Evaluar la capacidad inmunoprotectora de DiiA frente a colonización, neumonía invasiva y sepsis neumocócicas en modelos murinos.

RESULTADOS: En esta Tesis Doctoral, se han caracterizado en profundidad diversos aspectos de la proteína DiiA de *S. pneumoniae*. En primer lugar, se analizó la secuencia codificada por el locus *sp1992* de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*. Según bases de datos de proteínas, este locus codificaba una proteína “hipotética” exclusiva de neumococo. Un estudio más en profundidad del entorno genómico de *sp1992* mostró que dicho gen no se encontraba formando parte de ningún operón y que presentaba dos versiones alélicas de longitud variable. El alelo largo codificaba una proteína de 330 aminoácidos mientras que el alelo corto presentaba una delección, entre los residuos 11 y 93, por lo que codificaba una proteína de 247 aminoácidos.

La proteína SP1992 (renombrada como DiiA: *Dimorphic invasion-involved protein A*, proteína dimórfica A implicada en invasión) contenía un dominio LPxTG de anclaje a pared celular en su extremo C-terminal mientras que el resto de los residuos de esta proteína se encontraban expuestos al exterior. Esto justificaría la presencia de anticuerpos frente a esta proteína tanto en pacientes con enfermedad neumocócica como en individuos portadores (Giefing *et al.*, 2008). A continuación se encontraba el dominio de función desconocida DUF1542 que incluía dos regiones *coiled-coil*. La posible implicación de estas regiones en la oligomerización de la proteína se confirmó

in vitro mediante electroforesis en condiciones nativas y cromatografía de exclusión de tamaño. La región N-terminal contenía dos repeticiones imperfectas (denominadas aquí R1 y R2), con estructura de lámina- β , constituidas por 37 residuos que compartían un 51% de identidad. El alelo largo contenía las dos repeticiones mientras que el alelo corto solo contenía la repetición R2.

La secuencia de DiiA se comparó con proteínas de especies de estreptococos no patógenos y patógenos. En todos los casos el dominio de unión a pared fue LPxTG, pero la baja identidad de secuencia de las repeticiones en comparación con la de DiiA (< 50%), el distinto número de repeticiones y la ausencia del dominio DUF1542 indicaban que no presentaban una relación de ortólogos - genes con misma función heredados verticalmente por especiación - con DiiA, aunque su función pudiera estar relacionada. Estas variantes similares a *diiA* presentes en especies cercanas a neumococo presentaron diferencias en los genes flanqueantes y localización dentro del genoma, lo que respalda un origen evolutivo diferente.

Se confirmó la presencia del gen *diiA* en los 560 aislados clínicos de *S. pneumoniae* analizados mediante PCR, ya fuera el alelo largo (993 pb) o corto (744 pb). Mientras que la homogeneidad alélica en los 22 serotipos mayoritarios fue solo del 77.8%, en los 18 complejos clonales principales ascendió al 93.3%. Los aislados con alelo largo se asociaban significativamente a enfermedad invasiva ($P = 3 \times 10^{-6}$) mientras que los aislados con el alelo corto tendían a afectar a pacientes en grupos de riesgo: mayores de 70 años o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica ($P = 1 \times 10^{-10}$).

Para poder estudiar la implicación de las distintas secciones de DiiA en el proceso de infección, se utilizaron modelos murinos y mutantes isogénicos de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae* con deleciones progresivas del gen. Se observó que los mutantes sin repeticiones presentaban una capacidad de colonización reducida ($P < 0.001$). Durante la internalización en el pulmón de los animales y la diseminación al torrente circulatorio, el mutante carente de la repetición R1 disminuyó su virulencia ($P < 0.05$) respecto del mutante con dos repeticiones. En el ensayo de sepsis, el mutante TIGR4 Δ *diiA* mostró una disminución de más de 5 logaritmos en el índice de competitividad.

La interacción de DiiA con proteínas del hospedador se llevó a cabo utilizando un cribado con 12 proteínas de la matriz extracelular y del plasma mediante resonancia de plasmones de superficie. Se determinó que DiiA era capaz de unirse a colágeno y hololactoferrina con unas constantes de afinidad compatibles con unión específica, $K_D =$

4.6×10^{-7} y $K_D = 2.7 \times 10^{-9}$, respectivamente. Las consecuencias funcionales de la unión a hololactoferrina se estudiaron a nivel del sistema del complemento. En este caso se observó que la presencia de DiiA disminuía significativamente el depósito de C3b sobre la superficie bacteriana ($P < 0.01$).

Desde la perspectiva profiláctica, cuatro de cinco predictores determinaron que el área de las repeticiones presentaba entre el 50 y el 100% de los residuos inmunogénicos o constituyentes de epítomos, valores que se incrementan a más del doble cuando se normalizaron por longitud. Esto puede explicarse porque la zona con repeticiones es más hidrofóbica que la región sin repeticiones. La inmunización intraperitoneal con la variante de DiiA con dos repeticiones indujo una respuesta significativamente más amplia y potente en suero para todos los subtipos de inmunoglobulinas IgG analizadas que la variante sin repeticiones. El anti-suero fue capaz de reconocer cantidades de nanogramos de la proteína DiiA mediante *western blot*. Mediante citometría de flujo se determinó que los anticuerpos generados tras esta inmunización incrementaron los niveles de C3b sobre determinados serotipos de *S. pneumoniae* ($P < 0.01$). La inmunización con la variante de la proteína con dos repeticiones confirió una protección en ratón del 60% frente a la sepsis neumocócica por la cepa TIGR4 ($P = 9 \times 10^{-4}$). Sin embargo, la protección frente a neumonía bacteriémica no alcanzó valores de protección relevantes independientemente de si la inmunización fue intraperitoneal o intranasal.

La cantidad de inmunoglobulinas obtenida del lavado nasofaríngeo tras inmunización intranasal con la versión de DiiA que presentaba las dos repeticiones fue significativamente superior respecto al tratamiento solo con el adyuvante. Además, la carga bacteriana en la nasofaringe disminuyó en más de un logaritmo en los ratones inmunizados respecto de los tratados solo con el adyuvante ($P = 0.039$).

CONCLUSIONES:

1. DiiA es una proteína de superficie de *S. pneumoniae* con arquitectura típica de adhesina.
2. El gen *diiA* presenta dos alelos, largo y corto, con una o dos repeticiones internas, respectivamente.
3. El alelo largo se asocia a pacientes con enfermedad neumocócica invasiva mientras que el alelo corto a pacientes en grupos de riesgo.
4. DiiA es un factor de virulencia de *S. pneumoniae* en modelos murinos.

5. El fragmento desestructurado de DiiA contribuye a la interacción entre *S. pneumoniae* y su hospedador mediante colágeno y hololactoferrina *in vitro*.
6. Las repeticiones de DiiA son las regiones más inmunogénicas de dicha proteína tanto *in silico* como *in vitro*.
7. La inmunización sistémica y a nivel de mucosas con la variante de DiiA que presenta las dos repeticiones protege frente a sepsis y colonización, respectivamente, por la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*.

REFERENCIAS:

- Feldman, C. y Anderson, R. (2014). Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *J Infect.* **69**: 309-325.
- Giefing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Bui, M.D., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B.M., Schunn, M., Habel, A., Henriques-Normark, B., Ortvist, A., Kalin, M., von Gabain, A. y Nagy, E. (2008). Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med.* **205**: 117-131.
- Grabenstein, J.D. y Klugman, K.P. (2012). A century of pneumococcal vaccination research in humans. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* **18 Suppl 5**: 15-24.
- Gravekamp, C., Kasper, D.L., Michel, J.L., Kling, D.E., Carey, V. y Madoff, L.C. (1997). Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. *Infection and immunity.* **65**: 5216-5221.
- Henriques-Normark, B. y Tuomanen, E.I. (2013). The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* **3**.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C. y Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews Microbiology.* **6**: 288-301.
- Lin, I.H., Hsu, M.T. y Chang, C.H. (2012). Protein domain repetition is enriched in Streptococcal cell-surface proteins. *Genomics.* **100**: 370-379.
- McDaniel, L.S y Swiatlo, E. (2004). Pneumococcal Disease: Pathogenesis, Treatment, and Prevention. *Infect Dis Clin Pract.* **12**: 93-98.
- Monterrubio-López, G.P., González y Merchand, J.A. y Ribas-Aparicio, R.M. (2015). Identification of Novel Potential Vaccine Candidates against Tuberculosis Based on Reverse Vaccinology. *BioMed research international.* **2015**: 483150.
- Schulz, C. y Hammerschmidt, S. (2013). Exploitation of physiology and metabolomics to identify pneumococcal vaccine candidates. *Expert review of vaccines.* **12**: 1061-1075.
- Seib, K.L., Zhao, X. y Rappuoli, R. (2012). Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* **18 Suppl 5**: 109-116.
- Sette, A. y Rappuoli, R. (2010). Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity.* **33**: 530-541.

SUMMARY

Characterization of DiiA protein of *Streptococcus pneumoniae* and evaluation of its potential as vaccine antigen.

INTRODUCTION: *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) can be found in humans taking part of the nasopharyngeal microbiota, although it can spread causing invasive and non-invasive disease, mainly in children, elderly and immunocompromised patients (Henriques-Normark and Tuomanen, 2013). However, many aspects of the pathobiology of this bacterium are not well understood, in particular the transition from commensalism to virulence. Although the major virulence factor of pneumococcus is its polysaccharide capsule (McDaniel and Swiatlo, 2004), surface proteins play a fundamental role in the pathogenesis of the bacterium. These proteins interact directly with the host mediating, for example, colonization of the nasopharynx, internalization through alveolar epithelium and invasion of other tissues (Kadioglu *et al.*, 2008).

Surface proteins, which are involved in adhesion process, present a typical architecture that includes a cell wall anchoring domain, an unstructured stalk projected to the outside and - at the furthest point - repeated sequences that usually are β -strands (Lin *et al.*, 2012). The number of repeats varies among clinical isolates, which may affect both the affinity to the target molecule and the immunogenicity of the protein (Gravekamp *et al.*, 1997).

For years prevention of pneumococcal disease by vaccinating the risk population has been one of the major goals (Grabenstein and Klugman, 2012). Although licensed vaccines until now are made by capsular polysaccharides of the most invasive serotypes, they do not protect against all strains and it is mandatory then the development of universal protein-based serotype-independent vaccines (Feldman and Anderson, 2014). In this regard, reverse vaccinology is presented as a value tool in order to study new outside exposed proteins involved in virulence and showing immunoprotective activity (Sette and Rappuoli, 2010). For this purpose, genomic analysis and other technologies with high throughput screening are used in primary human pathogens (Seib *et al.*, 2012) (Monterrubio-López *et al.*, 2015). Proteins, which constitute a new vaccine, should ideally have the following features: to be exposed to the outside space; to be able to produce a complete immunological response in the host; to present limited allelic variability; to belong to a high number of clinical isolates; and

to be involved in one or more stages of the infection process (Schulz and Hammerschmidt, 2013).

GOALS:

1. To analyze essential genetic, genomics and proteic features of DiiA protein of *S. pneumoniae*.
2. To study the relationship between the allelic variability of DiiA and the epidemiologic profile of *S. pneumoniae*.
3. To justify the relevance of DiiA in pneumococcal invasive disease by murine models and in vitro assays.
4. To characterize the immunogenic response induced by DiiA.
5. To evaluate the protection of DiiA against pneumococcal colonization, invasive pneumonia and sepsis in murine models.

RESULTS: In this Doctoral Thesis, a deep characterization of the DiiA protein of *S. pneumoniae* has been developed. Firstly, the sequence codified by the locus *sp1992* of *S. pneumoniae* TIGR4 strain was analyzed. According to protein database, this locus codified an “hypothetical” protein exclusive of pneumococcus. A more detailed study of the genomic environment of *diiA* showed that this gene did not belong to any operon and had two allelic variants with different length. The long allele codified a 330 residues protein whereas the short allele showed a deletion between residues 11 and 93 and codified a 247 residues protein.

The protein SP1992 (renamed as DiiA: *Dimorphic invasion-involved protein A*) contained an LPxTG cell wall anchoring domain in the C-terminal region, while the rest of the residues of this protein were exposed to the outside. This fact justified the presence of antibodies against this protein both in patients with pneumococcal disease and in carriers (Giefing *et al.*, 2008). Next a domain with unknown function named DUF1542 was found having two *coiled-coil* regions. The possibility that these sequences could contribute to oligomerization was confirmed *in vitro* by electrophoresis in native conditions and size exclusion chromatography. The N-terminal region presented two imperfect repeats (named here R1 and R2), with β -sheet structure and 37 residues that shared 51% of identity. The long allele had two repeats while the short allele only had the repeat R2.

The sequence of DiiA was compared to proteins of pathogenic and non-pathogenic streptococcus species. In all cases the cell wall anchoring domain was LPxTG, but the low identity of repeat sequences (< 50%), the different number of repeats and the lack of DUF1542 domain indicated that they did not present a relationship of orthologs - genes with the same function vertically inherited by speciation - with DiiA, although their function could be related. These variants similar to *diiA* were also present in closely species to pneumococcus and showed differences in flanking genes and localization inside the genome, which support a distinct evolutionary origin.

The presence of *diiA* gene was confirmed in 560 clinical isolates of *S. pneumoniae* tested by PCR, either the long allele (993 bp) or the short allele (744 bp). Whereas the allele homogeneity in the more predominant 22 serotypes was only 77.8%, in the major 18 clonal complexes raised up to 93.3%. Isolates with the long allele were significantly associated to invasive disease ($P = 3 \times 10^{-6}$) and the isolates with the short allele tended to affect patients in groups of risk: older than 70 years old or patients with chronic obstructive pulmonary disease ($P = 1 \times 10^{-10}$).

To study the involvement of the different sections of DiiA in the infection process, murine models and step-wise isogenic mutants of *S. pneumoniae* TIGR4 strain were tested. It was observed that mutants without repeats showed a decreased capacity to colonize the respiratory tract ($P < 0.001$). During the internalization process in animal lungs and the dissemination to the bloodstream, the mutant without the R1 repeat reduced its virulence ($P < 0.05$) when compared to the mutant with two repeats. In the sepsis assay, TIGR4 Δ *diiA* mutant decreased the competitive index more than 5 logarithms.

The interaction of DiiA with host proteins was screened using 12 extracellular and plasma proteins and surface plasmon resonance technic. It was determined that DiiA bound to collagen and hololactoferrin with affinity values compatible with specific bindings, $K_D = 4.6 \times 10^{-7}$ y $K_D = 2.7 \times 10^{-9}$, respectively. Functional consequences of the hololactoferrin-binding were analyzed at complement system level. In this case, the presence of DiiA decreased significantly the deposition of C3b on the bacterial surface ($P < 0.01$).

From a prophylactic approach, four of five predictors determined that the area of repeats showed between 50 and 100% of the immunogenic or epitope-constituent residues, which increased more than double as it normalized by length. This could be explained because the zone with repeats was more hydrophobic than the region without

repeats. Intraperitoneally immunization with the variant of DiiA with two repeats induced a significant larger and more powerful response in serum for all the subtypes of immunoglobulins IgG tested in comparison to the variant without repeats. The anti-serum was able to recognize nanogram amounts of the protein DiiA by *western blot*. By flow cytometry it was determined that antibodies produced after this immunization process, increased the activation of C3b on the surface of certain serotypes of *S. pneumoniae* ($P < 0.01$). The immunization with the protein variant with two repeats conferred a protection in murine models of infection of 60% against the pneumococcal sepsis caused by TIGR4 strain ($P = 9 \times 10^{-4}$). However, protection against bacteriemic pneumonia did not reach relevant values regardless of the inoculation route of immunization.

The amount of immunoglobulins obtained from nasopharyngeal washes after intranasally immunization of mice with the two repeats version of DiiA was significantly higher compared to mice immunized only with the adjuvant. Moreover, the bacterial load in the murine nasopharynx decreased more than one logarithm compared to mice treated only with the adjuvant ($P = 0.039$).

CONCLUSIONS:

1. DiiA is a surface protein of *S. pneumoniae* that presents a typical adhesin architecture.
2. The *diiA* gene had two alleles, long and short, with one or two internal repeats, respectively.
3. The long allele is associated to patients with invasive pneumococcal disease, while the short allele is related to high risk patients.
4. DiiA is a virulence factor of *S. pneumoniae* in murine models.
5. The unstructured fragment of DiiA contributes to the interaction between *S. pneumoniae* and the host by collagen and hololactoferrin *in vitro*.
6. Repeats of DiiA are the most immunogenic regions of the protein *in silico* and *in vivo*.
7. Systemic and mucosal immunization with the variant of DiiA that has both repeats protects against sepsis and colonization, respectively, by *S. pneumoniae* TIGR4 strain.

REFERENCES:

- Feldman, C. and Anderson, R. (2014). Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *J Infect.* **69**: 309-325.
- Giefing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Bui, M.D., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B.M., Schunn, M., Habel, A., Henriques-Normark, B., Ortqvist, A., Kalin, M., von Gabain, A. and Nagy, E. (2008). Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med.* **205**: 117-131.
- Grabenstein, J.D. and Klugman, K.P. (2012). A century of pneumococcal vaccination research in humans. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* **18 Suppl 5**: 15-24.
- Gravekamp, C., Kasper, D.L., Michel, J.L., Kling, D.E., Carey, V. and Madoff, L.C. (1997). Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. *Infection and immunity.* **65**: 5216-5221.
- Henriques-Normark, B. and Tuomanen, E.I. (2013). The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* **3**.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C. and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews Microbiology.* **6**: 288-301.
- Lin, I.H., Hsu, M.T. and Chang, C.H. (2012). Protein domain repetition is enriched in Streptococcal cell-surface proteins. *Genomics.* **100**: 370-379.
- McDaniel, L.S and Swiatlo, E. (2004). Pneumococcal Disease: Pathogenesis, Treatment, and Prevention. *Infect Dis Clin Pract.* **12**: 93-98.
- Monterrubio-López, G.P., González, González y Merchand, J.A. and Ribas-Aparicio, R.M. (2015). Identification of Novel Potential Vaccine Candidates against Tuberculosis Based on Reverse Vaccinology. *BioMed research international.* **2015**: 483150.
- Schulz, C. and Hammerschmidt, S. (2013). Exploitation of physiology and metabolomics to identify pneumococcal vaccine candidates. *Expert review of vaccines.* **12**: 1061-1075.
- Seib, K.L., Zhao, X. and Rappuoli, R. (2012). Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* **18 Suppl 5**: 109-116.
- Sette, A. and Rappuoli, R. (2010). Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity.* **33**: 530-541.

I. INTRODUCCIÓN

1. *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ES UNO DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS EN HUMANOS

1.1. Características generales y aspectos históricos

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es una bacteria Gram-positiva que presenta una forma cocoide con extremos lanceolados. Se dispone típicamente en parejas, aunque también puede encontrarse formando cadenas cortas. Este microorganismo, anaerobio facultativo, es auxótrofo para la colina (Tomasz, 1967) y crece en agar sangre con atmósfera al 5% de CO₂ dando lugar a colonias α -hemolíticas. Su identificación se puede llevar a cabo mediante tres pruebas bioquímicas: ausencia de actividad catalasa, susceptibilidad a optoquina y solubilidad en sales biliares.

S. pneumoniae fue identificado por primera vez por Louis Pasteur y George M. Sternberg de manera independiente y casi simultánea en 1881 (Pasteur, 1881; Sternberg, 1881). Sin embargo, no fue hasta 1886 cuando Albert Fraenkel lo asoció como agente etiológico de neumonía en humanos (Fraenkel, 1886). En 1902 Friedrich Neufeld describió la Reacción de Quellung (“hinchazón”) como método serológico para tipificar neumococos (Neufeld, 1902). Desde entonces los esfuerzos para combatir las infecciones producidas por esta bacteria se centraron en la administración pasiva de anticuerpos frente a la cápsula (Avery, 1917). A partir de los años 40, la inmunoterapia fue substituida por la antibioterapia como medida frente a la enfermedad neumocócica (EN). Sin embargo, la aparición de aislados con susceptibilidad disminuida a dicho antibiótico, hizo que en la década de los sesenta se investigara en el desarrollo de una vacuna que previniera las infecciones neumocócicas.

1.2. Epidemiología de la enfermedad neumocócica

S. pneumoniae es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Feldman y Anderson, 2016). Entre los cuadros clínicos que produce destaca la neumonía adquirida en la comunidad, siendo el principal agente causal de la misma (Torres *et al.*, 2014). Esta supone un gasto de más de 10000 millones de euros anuales en Europa (Welte *et al.*, 2012), entre otras razones por la dificultad que puede conllevar su diagnóstico (Werno y Murdoch, 2008). Sin embargo, estos problemas se podrían minimizar con medidas profilácticas adecuadas, ya que neumococo es uno de las principales patógenos bacterianos prevenibles por vacunación (Myint *et al.*, 2013).

Los individuos con más riesgo de infección por esta bacteria son los niños menores de 2 años y los adultos mayores de 50 años (Torres *et al.*, 2015), ya que el sistema inmunitario (SI) no está lo suficientemente desarrollado en el caso de los niños y la funcionalidad del mismo suele verse comprometida a partir de cierta edad. En este sentido cabe destacar que pacientes con cualquier tipo de alteración inmunológica pueden verse afectados por la EN. Este es el caso de pacientes sometidos a terapia anti-rechazo de trasplantes (del Pozo, 2008), con ausencia anatómica o funcional del bazo, o con otras patologías de base como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Feldman y Anderson, 2014). Además, la co-infección con otros patógenos respiratorios, como el virus influenza, puede agravar el proceso infeccioso (Diavatopoulos *et al.*, 2010).

En función del grado de diseminación de la bacteria, la EN se puede agrupar en: EN no invasiva (ENNI) y EN invasiva (ENI). La ENNI se produce principalmente por afectación del tracto respiratorio y zonas periféricas dando lugar a sinusitis, otitis media aguda y neumonía. Otra forma de ENNI son las exacerbaciones agudas de la EPOC (EA-EPOC). Estas se deben a la colonización bacteriana de las vías respiratorias bajas, hecho que se asocia con una elevación significativa de marcadores inflamatorios, lo cual agrava la patología inflamatoria subyacente de la enfermedad (Cacho, 2007). La ENI se caracteriza por la presencia de *S. pneumoniae* en fluidos y tejidos corporales profundos que normalmente son estériles. Entre otras enfermedades incluye la sepsis y la meningitis. La neumonía se considera invasiva cuando neumococo llega a sangre tras su paso por el pulmón, denominándose entonces neumonía bacteriémica.

Algunas cepas de *S. pneumoniae* raramente producen infección, mientras que otras se asocian frecuentemente a ENI (Blomberg *et al.*, 2009). Los aislados de *S. pneumoniae* se clasifican genotípicamente en secuencitipos (ST) mediante el sistema de tipificación por secuenciación multilocus (MLST: *Multilocus Sequence Typing*) (Maiden *et al.*, 1998). El MLST implica la secuenciación de fragmentos de 7 genes del metabolismo central. A cada alelo de cada gen se le asigna un número por lo que un ST se determina por la combinación de 7 cifras. Aquellos ST que difieren en un único alelo se asocian en complejos clonales (CC). En este sentido se han descrito muchos trabajos que correlacionan la ENI con unos clones MLST determinados. Sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha un método que permita asociar genéricamente un aspecto común, como pueda ser la presencia de un gen, de todas las cepas a un tipo de EN (Domenech *et al.*, 2014; Manso *et al.*, 2014).

1.3. Factores de virulencia de *S. pneumoniae*

La capacidad de neumococo de causar infecciones en humanos está en parte relacionada con el genotipo de la bacteria, que determina la presencia o ausencia de genes de virulencia, la variación en la secuencia de éstos o la expresión de los mismos. Los factores de virulencia más importantes codificados por estos genes se describen a continuación.

1.3.1. Cápsula polisacáridica

La enorme mayoría de aislados clínicos de *S. pneumoniae* está rodeada por una cápsula polisacáridica (o polisacárido capsular; CPS: *capsular polysaccharide*) constituida por unidades repetitivas de azúcares (Kamerling, 2000). Su diversidad permite clasificar a *S. pneumoniae* en 96 serotipos según su composición y reactividad serológica (Park *et al.*, 2015). Su capacidad antigénica es la base de las actuales vacunas (Macleod *et al.*, 1945), ya que los anticuerpos anti-capsulares son los que confieren principalmente protección frente a la EN (Austrian, 1981).

Este elemento constituye el principal factor de virulencia de neumococo, ya que confiere al microorganismo la capacidad de evadir la fagocitosis mediada - o no - por el sistema del complemento (Hyams *et al.*, 2010; Hyams *et al.*, 2013). Además, cada tipo de cápsula confiere a neumococo unas propiedades que afectan a la interacción con el hospedador. De este modo, las cepas de los serotipos 3, 6B y 19F son más virulentas en pacientes adultos, mientras que las de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F afectan principalmente a niños (Henriques *et al.*, 2000). Por otro lado, los serotipos 19A y 19F y el serogrupo 6 tienden a formar biopelículas con mayor facilidad que el serotipo 24F y el serogrupo 18 (Domenech *et al.*, 2013). La cantidad de CPS sintetizado por neumococo varía además con las condiciones ambientales (Ogunniyi *et al.*, 2002) lo que probablemente afecta al grado de exposición de las proteínas de superficie al exterior, repercutiendo de este modo en la patogénesis de neumococo (Kim y Weiser, 1998).

1.3.2. Proteínas de superficie

S. pneumoniae presenta una serie de proteínas de superficie (SP: *surface protein*), que participan de manera relevante en la interacción patógeno-hospedador. La localización de las SPs no solo hace que estas intervengan en diferentes estadios de la

patogénesis, sino que también estimulan la síntesis de anticuerpos. Por estas dos razones, las SPs se han propuesto como candidatas en el diseño de nuevas vacunas con antígenos proteicos frente a la EN.

Algunas de las SPs son factores de virulencia que potencian la capacidad de adhesión de la bacteria al hospedador, como ocurre con las adhesinas. Las adhesinas presentan típicamente una arquitectura constituida por tres secciones: un anclaje a la pared celular, un tallo y una región distal que es muy variable y puede presentar diferentes combinaciones de distintos o el mismo dominio (Figura 1) (Szczesny y Lupas, 2008). El número de repeticiones del mismo dominio en algunas de estas proteínas puede variar de aislado a aislado, afectando a su comportamiento patogénico como es el caso de la proteína M de *Streptococcus pyogenes* y la familia de proteínas Rib/Alpha de *Streptococcus agalactiae*, las cuales promueven la unión e internalización en células del hospedador (Dombek *et al.*, 1999; Baron *et al.*, 2004). El número de repeticiones modifica la afinidad por la molécula diana y el carácter inmunogénico de la proteína (Gravekamp *et al.*, 1997), por lo que el número final de repeticiones es el resultado de un equilibrio entre la función y la capacidad para evadir al SI.



Figura 1. Modelo esquemático de la estructura de una adhesina. En azul el extremo distal, en naranja el tallo y en gris el dominio de anclaje a la pared. n: número de repeticiones.

Las SPs de neumococo pueden clasificarse según el tipo de anclaje a la pared celular e incluyen a las proteínas de unión a colina (CBPs: *choline binding proteins*), las lipoproteínas, las proteínas LPxTG, las proteínas de la familia triada de polihistidinas (Pht: *polyhistidine triad*) y las proteínas de superficie no clásicas (Figura 2). Las proteínas de superficie más destacadas de cada grupo se describen a continuación.

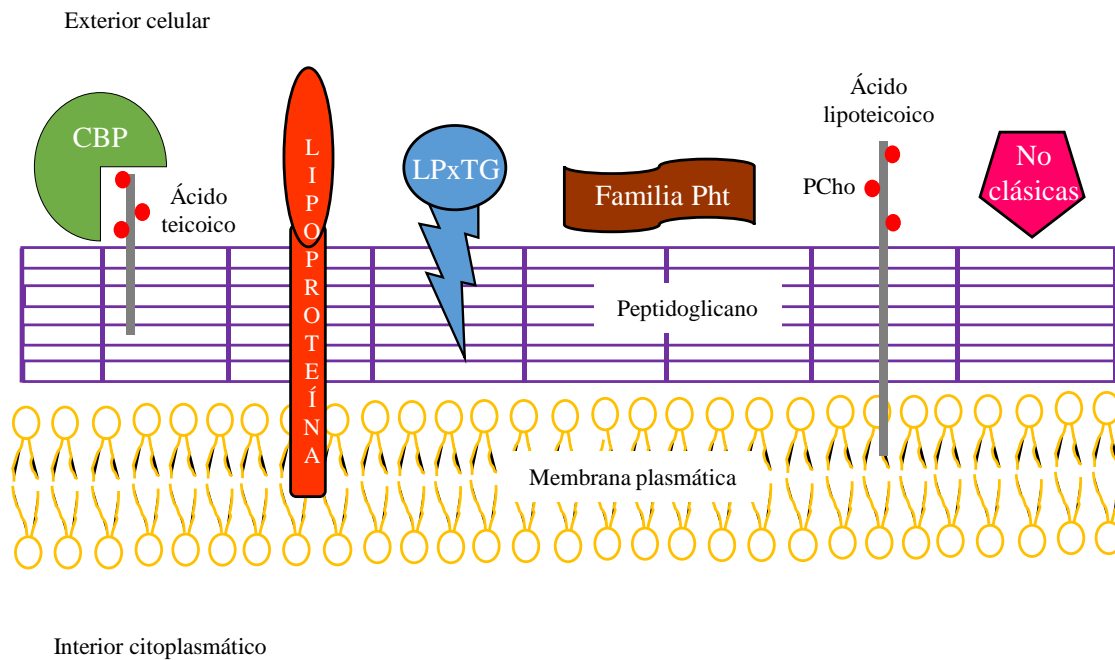


Figura 2. Modelo esquemático de la localización de las proteínas de superficie de *S. pneumoniae*. CBP: proteína de unión a colina; LPxTG: proteína LPxTG; Familia Pht: proteína de la familia triada de polihistidinas; No clásica: proteína de superficie no clásica; PCho: residuo de fosforilcolina.

Proteínas de unión a colina

S. pneumoniae posee fosforilcolina (PCho: *phosphorylcholine*) en su pared celular. Las CBPs se caracterizan por presentar secuencias repetidas de unos 20 aminoácidos denominadas módulos de unión a colina. La sucesión en tándem de entre 2 y 12 módulos forman el dominio de unión a colina (Figura 3A) gracias al cual la bacteria es capaz de unirse a la PCho. *S. pneumoniae* posee entre 10 y 15 CBPs, dependiendo de la cepa de neumococo. A continuación se describen algunas de las CBPs más destacadas y su papel en virulencia.

La LytA es una autolisina con actividad amidasa que hidroliza el péptidoglicano (López y García, 2004), siendo la principal responsable de la autólisis celular. Durante este proceso se libera la citotoxina neumolisina, así como otros productos derivados de la degradación de la pared celular, que producen una inflamación importante dañando las barreras epiteliales y endoteliales. Esto permite a neumococo acceder al torrente circulatorio y diseminarse por el cuerpo humano (Berry y Paton, 2000). LytA tiene efectos pleiotropicos en la activación del sistema del complemento, ya que por una parte previene la unión de C1q y de la proteína C reactiva (CRP: *C-reactive protein*) sobre la superficie bacteriana reduciendo la activación de la vía clásica del complemento, además recluta la proteína de unión al factor C4b del complemento (C4BP: *C4b-binding*

protein) C4BP y factor H (FH) que inhiben la cascada del complemento y escinde los componentes C3b y iC3b. Se ha demostrado, además, que estos efectos potencian la virulencia de neumococo en el establecimiento de la neumonía neumocócica y de la ENI (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015).

La LytB presenta actividad amidasa y juega un papel esencial en la separación de las células hijas, como sugieren los mutantes en LytB, que dan lugar a largas cadenas (García *et al.*, 1999a, b; López *et al.*, 2000). Más allá del papel en patogénesis causado por el encadenamiento (Dalia y Weiser, 2011), un trabajo ha demostrado la contribución directa de LytB en virulencia mediando la adhesión a células de nasofaringe humana durante el proceso de colonización nasofaríngea, la evasión de la fagocitosis mediada por el sistema del complemento y el establecimiento de sepsis y neumonía en modelos murinos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011).

La LytC es una lisozima implicada en el fratricidio celular (Claverys y Håvarstein, 2007). Este fenómeno contribuye a la virulencia, ya que agrava la infección debido a la liberación de factores de virulencia y mediadores inflamatorios. El ADN liberado por la lisis bacteriana es adquirido por las células competentes, lo que da lugar a un incremento en la transferencia de genes y, potencialmente, al aumento de la resistencia antibiótica (Johnsborg *et al.*, 2009). LytC actúa, junto con LytB, contribuyendo al establecimiento de neumonía y sepsis neumocócica en modelos animales (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011).

La Pce es una esterasa que se encarga de modular la distribución de PCho de los ácido teicoicos en la superficie bacteriana (Gosink *et al.*, 2000) regulando indirectamente la unión de CRP a PCho y de esta manera la activación del SI del hospedador. Por otro lado, los residuos de PCho presentes en la superficie bacteriana permiten la unión al receptor celular del factor activador de plaquetas (PAFR: *platelet-activating factor receptor*), lo que promueve la diseminación a través del epitelio respiratorio por parte de *S. pneumoniae* (Cundell *et al.*, 1995). Además, se ha demostrado que esta proteína favorece el proceso invasivo de neumococo a través de la matriz extracelular mediante su interacción con plasminogeno/plasmina (Attali *et al.*, 2008).

La PspC es una adhesina que media la unión del patógeno con el receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR: *polymeric immunoglobulin receptor*) expresado en células del epitelio respiratorio humano, lo que permite la colonización, así como la invasión vía transcitosis a través del epitelio (Zhang *et al.*, 2000). PspC también se une y activa

células del epitelio y del endotelio gracias a la captación de FH (Quin *et al.*, 2007; Agarwal y Hammerschmidt, 2009). Además, PspC interacciona con vitronectina, una glicoproteína de matriz extracelular que se expresa en las vías aéreas del epitelio, favoreciendo la colonización de neumococo (Voss *et al.*, 2013). Por otro lado, esta proteína interfiere en la activación del complemento por la vía clásica y alternativa reclutando en su superficie C4BP y FH, respectivamente (Dieudonne-Vatran *et al.*, 2009; Hyams *et al.*, 2013). De este modo neumococo previene el depósito de las opsoninas C3b e iC3b, dando lugar a una fagocitosis incompleta.

La PspA interfiere en la activación de la vía clásica del complemento impidiendo la unión de la CRP a la PCho situada en la superficie de neumococo (Suresh *et al.*, 2006; Mukerji *et al.*, 2012). Además, permite evadir la actividad de la vía alternativa del complemento mediada por el factor B (Tu *et al.*, 1999; Yuste *et al.*, 2005). Todo esto implica un efecto inhibitorio de PspA en la fagocitosis de la bacteria (Ren *et al.*, 2012). Esta proteína interacciona con la lactoferrina humana neutralizando la actividad bactericida de esta molécula (Shaper *et al.*, 2004).

La PcpA media la adhesión de neumococo a células del epitelio de la nasofaringe y de pulmón, siendo este efecto inhibido por anticuerpos humanos anti-PcpA (Khan *et al.*, 2012).

Lipoproteínas

Las lipoproteínas son sintetizadas como precursores, de tal manera, que presentan tres elementos: un péptido señal en el extremo N-terminal que dirige la secreción de la prolipoproteína, la *lipobox* que permite el anclaje a la membrana bacteriana y el dominio de función (Figura 3B). El genoma de *S. pneumoniae* contiene aproximadamente 40 genes que codifican lipoproteínas (Tettelin *et al.*, 2001; Bergmann y Hammerschmidt, 2006), incluyendo transportadores ABC implicados en la captación de oligoelementos importantes o la expulsión de antimicrobianos. Algunos de los más importantes se explican a continuación.

La PsaA actúa como transportador de manganeso necesario para la supervivencia en zonas del hospedador donde las concentraciones de este elemento sean bajas (Honsa *et al.*, 2013), agente protector frente al estrés oxidativo (Tseng *et al.*, 2002) y la adhesión a células del epitelio respiratorio (Novak *et al.*, 1998). Concretamente, PsaA es una proteína que favorece la adhesión del patógeno a las células del epitelio nasofaríngeo mediante la interacción con E-cadherina (Anderton *et al.*, 2007).

PiuA y PiaA son transportadores de hierro relevantes en los procesos de neumonía y sepsis (Brown *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2002a).

La PotD forma parte de un transportador ABC de poliaminas, un nutriente esencial para neumococo durante la infección en modelos murinos (Ware *et al.*, 2006).

AdcA y AdcAII son transportadores de zinc también implicados en virulencia (Dintilhac *et al.*, 1997; Bayle *et al.*, 2011).

Proteínas LPxTG

Las proteínas LPxTG se unen covalentemente a la treonina que forma parte del péptido de pentaglicina del peptidoglicano de la pared de neumococo gracias a una sortasa-A que reconoce el grupo carboxilo terminal de la secuencia de aminoácidos LPxTG (Schneewind *et al.*, 1995) (Figura 3C). Los genomas de neumococo contienen al menos 18 proteínas de este tipo (Pérez-Dorado *et al.*, 2012). Las más destacadas se describen en los siguientes párrafos.

La NanA es una neuraminidasa que escinde residuos de ácido siálico presentes en glucoproteínas, glucolípidos, mucinas y oligosacáridos del hospedador, de manera que en el epitelio quedan expuestos receptores que permiten la adhesión de neumococo al mismo (King *et al.*, 2006).

PrtA es una serín-proteasa con importante actividad en virulencia estudiada en modelos animales (Bethe *et al.*, 2001), entre otras razones por su capacidad de unirse a colágeno IV (Frolet *et al.*, 2010). Paradójicamente, está implicada en la muerte de *S. pneumoniae* mediada por lactoferrina (Mirza *et al.*, 2011).

La Hly es una hialorunidasa que degrada el ácido hialurónico que forma parte del tejido conectivo y de la matriz extracelular (Rapport *et al.*, 1951), lo cual favorece la colonización y la diseminación de la bacteria (Feldman *et al.*, 2007). Además, esta actividad potencia la inflamación pulmonar, ya que los productos de degradación del ácido hialurónico estimulan la producción de citoquinas por macrófagos (McKee *et al.*, 1996), lo que incrementa el reclutamiento celular y la inflamación.

Se han descrito dos tipos de pili en neumococo (PI-1 y PI-2) codificados por distintas islas de patogenicidad (Bagnoli *et al.*, 2008). Todos ellos están constituidos por proteínas RrgB que configuran el esqueleto de la estructura, dos o tres clusters de RrgA que constituyen la subunidad mayor y moléculas RrgC que anclan la proteína (Hilleringmann *et al.*, 2009). La subunidad RrgA media la adhesión de neumococo a

células del epitelio respiratorio y la matriz extracelular vía colágeno, fibronectina y laminina (Nelson *et al.*, 2007a; Hilleringmann *et al.*, 2008).

Al grupo de metaloproteinasas de Zn pertenecen 4 enzimas. La ZmpA (proteasa IgA1) se adhiere a la fracción constante de los anticuerpos anti-capsulares IgA1 de mucosas atenuando la función protectora de los mismos (Janoff *et al.*, 2014), por lo que está implicada en el proceso de colonización e infección neumocócica. La ZmpB parece tener función de adhesina interaccionando con el colágeno IV (Brittan *et al.*, 2012) e interfiere en la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular (Surewaard *et al.*, 2013).

Proteínas de la familia Pht

Esta familia recientemente descubierta consta de 4 miembros: PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. Todos ellos comparten una amplia secuencia de péptidos y contienen 5 (PhtA, PhtB, PhtD) o seis (PhtE) motivos característicos de triadas de histidina (HxxHxH) (Adamou *et al.*, 2001). Aunque presentan una secuencia señal de tipo II para su secreción (Figura 3D), no está claro el mecanismo de liberación al medio. Se ha mostrado que las proteínas de la familia Pht son necesarias para inhibir el depósito de complemento en la superficie de neumococo mediante el reclutamiento de FH (Ogunniyi *et al.*, 2009). La pérdida de las 4 proteínas en neumococo produce una marcada reducción en adherencia a células de nasofaringe y del epitelio pulmonar (Kallio *et al.*, 2014). Las proteínas de la familia Pht desempeñan un papel en el mantenimiento de la homeostasis del zinc (Rioux *et al.*, 2011).

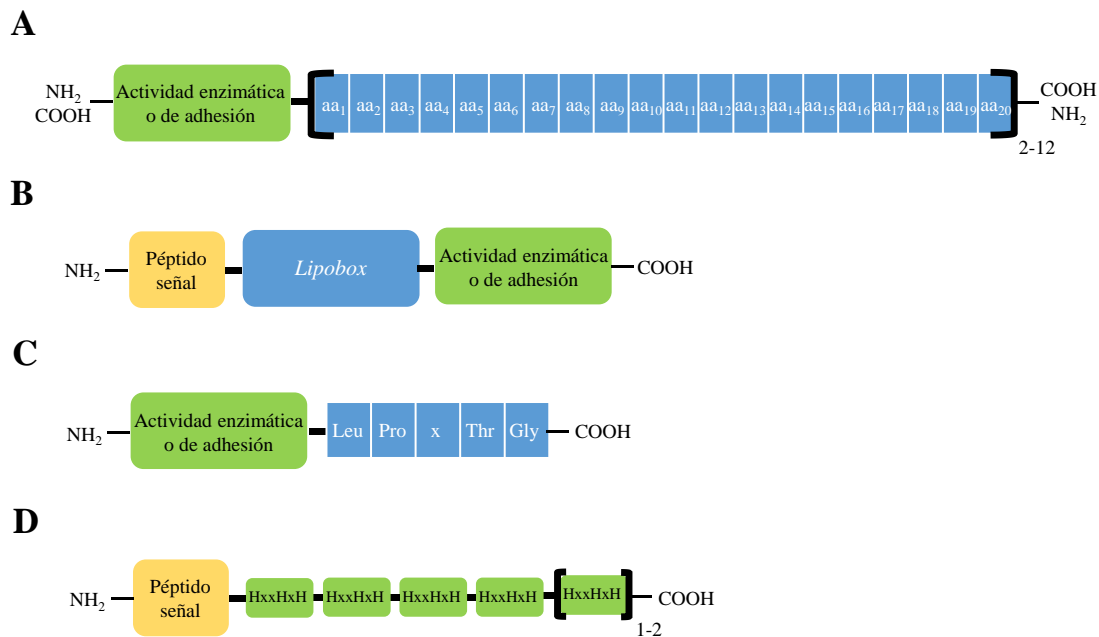


Figura 3. Estructuras genéricas de las proteínas de superficie. A: Proteína de unión a colina. B: Lipoproteína. C: Proteína LPxTG. D: Proteína de la familia Pht. Se muestra el dominio de anclaje (azul) y el dominio catalítico (verde).

Proteínas de superficie no clásicas

Algunas SPs no poseen péptido señal o motivos de anclaje reconocibles. Estas son proteínas que pueden intervenir como enzimas en vías metabólicas troncales en el citoplasma y que en una fracción se sitúan mediante un mecanismo desconocido en la superficie jugando un papel funcional adicional relacionado con la interacción con el hospedador. Entre ellas destacan la α -enolasa y la gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa, enzimas glucolíticas que se unen a plasminógeno potenciando la capacidad de neumococo para degradar la matriz extracelular e invadir los tejidos en el hospedador (Bergmann *et al.*, 2013).

1.3.3. Neumolisina

Es una toxina que se une al colesterol de las membranas del hospedador (Walker *et al.*, 1987). La localización de varios monómeros en la superficie de la célula diana (Gilbert *et al.*, 1999) da lugar a la formación de un poro que altera la integridad celular (Tilley *et al.*, 2005), favorece la invasión y la ruptura de barreras promoviendo la diseminación de neumococo (Witzenrath *et al.*, 2006; Marriott *et al.*, 2008). Los efectos proinflamatorios de neumolisina incluyen la estimulación de la producción de TNF,

IL-1, IL-8 e IL-6 en células dendríticas, macrófagos, células epiteliales y células endoteliales (Braun *et al.*, 1999; Ratner *et al.*, 2006; McNeela *et al.*, 2010; Luttge *et al.*, 2012; Neill *et al.*, 2014), lo que potencia la patogénesis y diseminación de la bacteria. Además, la neumolisina activa la vía clásica del complemento (Paton *et al.*, 1984), mecanismo por el cual neumococo disminuye las reservas de complemento. Esta proteína inhibe indirectamente la migración de neutrófilos, interfiriendo con la activación del complemento (Surewaard *et al.*, 2013).

1.4. Mecanismos de defensa del hospedador

El ser humano posee diversos mecanismos mediados principalmente por el SI para evitar la infección por *S. pneumoniae*. La respuesta inmunitaria (RI) ante la presencia de un patógeno consiste en dos fases. Una inicial e inespecífica, denominada RI innata (RII), y una segunda conocida como RI adquirida (RIA). Los fundamentos de la vacunación se basan en dos rasgos fundamentales de la RIA: la especificidad y la memoria. Tanto la RII, como la RIA están constituidas por elementos de la respuesta humoral y celular.

1.4.1. Respuesta humoral

Es el principal mecanismo de defensa frente a microorganismos extracelulares y sus toxinas, y su actividad esta mediada principalmente por el sistema del complemento y los anticuerpos.

El sistema del complemento está constituido por proteínas presentes en la circulación sanguínea, los fluidos corporales y los tejidos que ejercen su acción en cascada tras reconocer al microorganismo invasor. Cada uno de los componentes (Cx) de esta cascada proteolítica es activado mediante hidrólisis en dos fragmentos designados con los sufijos “a” y “b”, por ejemplo, C3 es escindido en C3a y C3b. Existen tres tipos diferentes de cascadas, según el modo de activación del complemento, denominadas: vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas. Sin embargo, todas convergen en la molécula C3, que es el componente clave del sistema del complemento. En la infección neumocócica el sistema del complemento participa en la opsonización de la bacteria por el componente C3b el cual, al unirse a receptores específicos presentes en las células fagocíticas, facilita una fagocitosis posterior de la bacteria. Concretamente, en la vía clásica del complemento el principal mecanismo de activación es la unión de la fracción constante de las inmunoglobulinas al componente C1 (Celik *et al.*, 2001; Walport,

2001). Esta vía es una de las principales en la RII frente a *S. pneumoniae* tanto en el ratón como en los seres humanos, lo que confirma su importancia en el reconocimiento del patógeno y en su eliminación (Brown *et al.*, 2002b; Yuste *et al.*, 2008). Como reguladores negativos del sistema del complemento se encuentran: C4BP y FH.

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas (Ig), son moléculas producidas por los linfocitos B. Estos se encuentran presentes en el suero y líquidos orgánicos de mamíferos. Una molécula de anticuerpo está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas: dos ligeras y dos pesadas, las últimas permiten la diferenciación en clases y subclases. A su vez cada cadena presenta una fracción constante (Fc) en el extremo C-terminal y una variable (Fab) en el extremo N-terminal. Los anticuerpos contribuyen directa e indirectamente a la opsonización del microorganismo, de manera que permiten la fagocitosis del mismo. Además, los anticuerpos pueden unirse a toxinas y proteínas bacterianas implicadas en invasión bloqueando su actividad. En humanos existen 5 clases de Ig: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. La IgG representa el 70-75% del reservorio total de Ig y se halla distribuida en los espacios intravascular y extravascular. El hombre presenta las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, mientras que el ratón posee IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Las subclases de inmunoglobulinas parecen haber surgido después de la formación de las especies, de manera que las subclases en humanos no son comparables a las de ratón (Mestas y Hughes, 2004). La IgA representa el 15-20% del reservorio de Ig séricas humanas, siendo predominante en las secreciones seromucosas. Se conocen dos subclases en humanos IgA1 e IgA2, pero en ratones solo existe una subclase designada como IgA y generalmente se encuentra en forma dimérica en el suero a diferencia de la humana. La IgM representa alrededor del 10% del reservorio total de inmunoglobulinas. Tiene estructura pentamérica y baja afinidad. Está confinada prácticamente al espacio intravascular siendo la predominante en la RII. La diversidad estructural en las clases y subclases sugiere que las Ig desempeñan funciones secundarias, a parte de su función primaria de unirse específicamente al antígeno. En la respuesta mediada por anticuerpos hay que tener en cuenta tres aspectos: el cambio de isotipo de Igs (de IgM a IgG o IgA), la maduración de la afinidad (Igs más específicos frente al antígeno) y el desarrollo de células memoria. En los tres casos es fundamental una respuesta mediada por linfocitos T (L_T), la cual se produce en presencia de antígenos proteicos.

1.4.2. Respuesta celular

Cuando una bacteria accede a una localización en el hospedador, se desencadena una serie de interacciones entre elementos del microorganismo y los sensores del hospedador, lo que en condiciones normales da lugar a una activación adecuada del SI mediante redes dinámicas que implican tanto a las células del SI, como a sus moléculas mediadoras comentadas en el apartado anterior (Kumar *et al.*, 2011, 2012).

Los fagocitos son células que expresan una familia de receptores innatos o sensores que reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (PRR: *pattern-recognition receptor*) y detectan moléculas características de los agentes patógenos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP: *pathogen-associated molecular pattern*). El reconocimiento de los PAMPs por los PRRs dispara rápidamente la producción de citoquinas inflamatorias y la activación de la RIA que involucra a las células linfocitarias (Kawai y Akira, 2010).

Los linfocitos B (L_B) expresan en su superficie Igs como receptores específicos de antígenos. Tras su activación y diferenciación mediada por citoquinas, secretan Igs de distintas clases.

Los linfocitos T (L_T) se identifican por presentar en su membrana el marcador CD3, además, según al subgrupo al que pertenezcan expresan el correceptor CD4 o CD8. Los L_T CD4⁺ se conocen como células colaboradoras, por su parte los L_T CD8⁺ se denominan células citotóxicas. La función de los L_B y L_T de memoria es identificar el antígeno en exposiciones sucesivas, iniciando una respuesta mucho más rápida que la que se produjo por primera vez. La memoria inmunológica prepara al SI a futuras exposiciones naturales y produce un efecto potenciador tras una revacunación (Paradiso, 2012).

1.5. Patogénesis de la infección neumocócica

1.5.1. Estado de portador

S. pneumoniae se transmite de persona a persona a través de gotículas o aerosoles (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013). La colonización asintomática del tracto respiratorio superior por neumococo se conoce como estado de portador. Cuando neumococo entra en la cavidad nasal, las cargas negativas de la cápsula protegen a la bacteria de ser atrapada por el moco, de tal modo que el microorganismo es capaz de atravesarlo (Nelson *et al.*, 2007b). Este proceso también se ve favorecido por enzimas

bacterianas que degradan componentes del moco (Xu *et al.*, 2011), con el fin de disminuir su viscosidad y obtener nutrientes. Una vez que neumococo alcanza el epitelio nasofaríngeo sufre un cambio de fase por el cual la bacteria pasa de presentar un fenotipo opaco, caracterizado por una cápsula gruesa, a presentar un fenotipo transparente, por el adelgazamiento de la misma, lo que permite a neumococo exponer proteínas de superficie que le confieren capacidad de adhesión a las células del epitelio nasofaríngeo (Weiser *et al.*, 1994; Kim y Weiser, 1998). Se establece así un primer contacto directo entre la bacteria y el hospedador. Esta interacción, al igual que otras que se producen durante el proceso infeccioso, permite no solo la invasión por parte de neumococo, sino también la activación del SI del hospedador. Ante la presencia de neumococo en nasofaringe se inicia una respuesta inflamatoria controlada. En modelos murinos se ha demostrado que el estado de portador depende del equilibrio entre la inflamación mediada por linfocitos Th17 y L_T antiinflamatorios (Zhang *et al.*, 2009), de manera que neumococo puede ser eliminado de la nasofaringe (Das *et al.*, 2014) o puede llegar a producir infección. La colonización de la nasofaringe por neumococo es, por tanto, una condición típicamente necesaria para el desarrollo de la infección neumocócica, en especial para algunos serotipos (Greenberg *et al.*, 2011). La tasa de colonización alcanza su pico más alto entorno a los 2-3 años de edad para luego disminuir hasta un 10% en adultos (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013), debido a la adquisición progresiva de inmunidad humoral y celular (Cobey y Lipsitch, 2012). La colonización constituye, por tanto, una forma de inmunización parcial frente a la EN (Wilson *et al.*, 2017). Por otra parte, la inmunidad a nivel de mucosas disminuye el estado de portador nasofaríngeo, de manera que se consigue una inmunidad de grupo.

1.5.2. Enfermedad neumocócica

S. pneumoniae puede diseminarse desde la nasofaringe, por proximidad, a las fosas nasales y el oído medio. Para ello degrada el moco escindiendo residuos de ácido siálico mediante la neuraminidasa NanA (King *et al.*, 2006). A su vez, ZmpA inhibe la actividad fagocítica mediada por IgA presente en mucosas (Janoff *et al.*, 2014) y la proteína PsaA, por su parte, interacciona con células del epitelio nasofaríngeo permitiendo la adhesión de la bacteria (Anderton *et al.*, 2007). En regiones mucosas, como las citadas anteriormente, uno de los principales mecanismos de neumococo para el desarrollo de la infección es la formación de biopelículas. Teniendo en cuenta que el primer estadio en este proceso es la adhesión, es lógico pensar que las proteínas de

superficie están implicadas en las fases iniciales como se ha descrito previamente (Sánchez *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que los diferentes tipos capsulares de neumococo también influyen de distinto modo en la capacidad de dicha bacteria para formar biopelículas (Domenech *et al.*, 2013). La formación del biopelícula permite a la bacteria persistir de manera crónica en una localización a pesar de los cambios nutricionales o ambientales que se produzcan en el entorno y protegerse del SI del hospedador y de la actividad de los antibióticos (Fux *et al.*, 2005).

La bacteria puede descender desde la nasofaringe al pulmón mediante aspiración de secreciones respiratorias (Collins *et al.*, 2014). En el pulmón, neumococo continua interaccionando con elementos de la matriz extracelular como el colágeno, mediante PrtA (Frolet *et al.*, 2010) y pilus tipo II (Hilleringmann *et al.*, 2008), lo que favorece la adhesión al epitelio pulmonar. Al mismo tiempo, el reconocimiento de PAMPs presentes en neumococo por PRRs presentes en fagocitos y células epiteliales de la zona, inicia una respuesta encaminada a eliminar la bacteria del pulmón. A este proceso hay que añadir el efecto bactericida de la lactoferrina (Arnold *et al.*, 1980) presente en mucosas (Jeffery, 1987). Sin embargo, la actividad de esta glicoproteína se puede ver inhibida, ya que neumococo gracias a PspA es capaz de secuestrarla (Shaper *et al.*, 2004). Los macrófagos alveolares fagocitan a neumococo gracias a la opsonización del mismo con anticuerpos y C3b, acción minimizada por LytA que evita el depósito de C1q y CRP sobre la bacteria (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Además, estas células inician la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Sharif *et al.*, 2013) que reclutan neutrófilos procedentes de capilares y estimulan L_T que permiten la producción de inmunoglobulinas específicas en suero y secreciones. Todo ello con el fin de erradicar la infección. En zonas fisiológicamente alteradas como son los pulmones de un paciente con EPOC, neumococo puede persistir durante largos periodos de tiempo provocando periódicamente EA-EPOC, sin embargo, los mecanismos por lo que esto ocurre no se han dilucidado todavía.

Si el SI no es capaz de controlar la infección localmente, neumococo puede atravesar los tejidos hasta alcanzar el torrente circulatorio. Para ello se une a receptores celulares como pIgR y PAFR, a través de PspC (Zhang *et al.*, 2000) y de residuos de PCho (Cundell *et al.*, 1995), respectivamente, lo que permite a neumococo internalizarse en células pulmonares y llegar a sangre. A este proceso de invasión coopera la neumolisina que mediante su actividad citotóxica altera la integridad de las barreras celulares (Marriott *et al.*, 2008). El paso al torrente circulatorio expone a neumococo a elevadas

concentraciones de elementos de la inmunidad humoral y celular, por lo que la bacteria cambia de nuevo su fenotipo (engrosando su cápsula) (Kim y Weiser, 1998) para evitar ser fagocitada (Hyams *et al.*, 2010; Hyams *et al.*, 2013). En este sentido cabe destacar también la actividad pleiotrópica de LytA, puesto que inhibe la vía clásica y alternativa del complemento reclutando C4BP y FH (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). La RI frente a la cápsula, las proteínas de superficie y la neumolisina modulan la respuesta inflamatoria del hospedador en la bacteriemia neumocócica. Sin el tratamiento adecuado, esta respuesta extrema del hospedador puede conducir a un fallo multiorgánico. En el caso de que neumococo consiga atravesar además la barrera hematoencefálica, en líquido cefalorraquídeo genera una respuesta proinflamatoria profunda que degenera en la apoptosis de células neuronales, lo que contribuye de manera importante a la muerte del paciente.

2. MEDIDAS PROFILÁCTICAS FRENTE A LA INFECCIÓN NEUMOCÓCICA

2.1. Vacunología clásica y reversa

Las vacunas son uno de los hallazgos médicos más exitosos en la historia de la humanidad y se estima que previenen más de 2.5 millones de muertes cada año (WHO, 2013). El fundamento de las vacunas consiste en inducir una RI, mediante la introducción de una formulación inocua en el organismo del hospedador, que proteja frente a futuras infecciones. Como consecuencia, no solo se previene la infección del individuo inmunizado, sino que además disminuye la difusión del patógeno al resto de individuos de la sociedad por un efecto denominado “inmunidad de grupo”.

Mucho ha evolucionado la metodología de producir vacunas desde sus inicios (Fenner, 1988). Especialmente, desde que a finales del siglo XX, se incluyera la tecnología del ADN recombinante y la secuenciación genómica completa en el campo de la vacunación. Esto cambió completamente el modo de diseñar vacunas. Las tecnologías basadas en el conocimiento de genomas completos de microorganismos patógenos dio lugar a lo que se conoce como vacunología reversa (VR), frente a la vacunología clásica basada en ensayos de tipo prueba y error desde el patógeno original (Pasteur, 1880). La VR se basa en el uso de la información genómica de un microorganismo para identificar potenciales dianas antigénicas que no han podido ser identificadas con las técnicas clásicas (Rappuoli, 2001). Esta metodología se lleva a

cabo mediante ensayos que no requieren del crecimiento del microorganismo. El primer paso en la VR es la obtención de información acerca de los antígenos proteicos de la bacteria mediante tecnologías OMICAs, como la pangenOMICA o la antigenOMICA, y la genómica funcional que incluye la mutagénesis dirigida, la expresión *in vivo* y los microarrays de ADN (Capecchi *et al.*, 2004). Posteriormente, se lleva a cabo un abordaje computacional a partir de secuencias que permite predecir rasgos característicos de las proteínas como su localización celular y su arquitectura de dominios para poder inferir la función de dichas proteínas (Kall *et al.*, 2004; Punta *et al.*, 2012). Además, las herramientas bioinformáticas pueden simular la RI en el ser humano frente a un microorganismo, analizando características del antígeno como su hidrofobicidad y su antigenicidad (Kolaskar y Tongaonkar, 1990; Yao *et al.*, 2012).

En el caso de neumococo, los análisis genómicos y predicciones bioinformáticas han descrito que de los más de 2000 genes que presenta esta bacteria, 69 codifican proteínas de superficie en la cepa TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001). Algunas de estas son proteínas “hipotéticas” (se desconoce su función), aunque por su localización se intuye que podrían estar implicadas en la virulencia de la bacteria. Teniendo esto en cuenta, es previsible que algunas de ellas no se expresen en condiciones *in vitro*, donde su función no sería requerida, de la misma manera que en condiciones *in vivo*. Es en estos casos es imprescindible la aplicación de la VR para su estudio. Si bien es cierto que esta metodología se está aplicando en el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis* con prometedores resultados (Monterrubio-López *et al.*, 2015), el gran potencial que posee la VR queda reflejado en la recientemente comercializada vacuna frente a *Neisseria meningitidis* del serogrupo B que ha supuesto todo un avance en el desarrollo de nuevas vacunas (Seib *et al.*, 2012).

2.2. Vacunas actuales frente a *S. pneumoniae*: polisacarídica y conjugadas

La alta tasa de morbilidad y mortalidad asociada a la EN junto con el incremento de cepas de neumococo que presentan resistencia a antibióticos hacen atractiva la profilaxis mediante vacunas frente a este microorganismo (Feldman y Anderson, 2016). Actualmente se encuentran disponibles en el mercado dos tipos de vacunas para prevenir las ENs: la vacuna polisacarídica (PPV: *pneumococcal polysaccharide vaccine*) y las vacunas polisacarídicas conjugadas (PCV: *pneumococcal conjugate vaccine*).

La primera PPV aprobada fue la vacuna 23-valente (PPV23) que se comercializó en el año 1983 y estaba constituida por 23 polisacáridos capsulares. Esta vacuna contenía 25 µg de cada uno de los siguientes polisacáridos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F y 33F. La selección de estos 23 polisacáridos se debe a que en la época de su comercialización, estos serotipos causaban el 87% de las bacteriemias neumocócicas (Hilleman *et al.*, 1981; Robbins *et al.*, 1983). En estudios posteriores se observó que más del 80% de los adultos sanos que recibieron la PPV23 desarrollaron Igs frente a los serotipos incluidos en la vacuna a las dos o tres semanas y que los niveles de Igs generados por esta vacuna permanecían elevados por un máximo de 5 años (CDC, 2010). Aunque en términos generales se ha demostrado que PPV23 protege frente a la ENI en adultos sanos (Shapiro, 1991), se debate la efectividad de esta vacuna en la prevención de ENNI (Örtqvist, 1998). Además, la PPV23 estimula los L_B, pero no produce respuesta dependiente de L_T, por lo que la respuesta a la mayoría de los serotipos es generalmente muy pobre en niños menores de dos años (Overturf, 2000). Esto se debe a que la respuesta inmunogénica frente a polisacáridos en este grupo de edad no está desarrollada, por lo que esta vacuna no está indicada en población pediátrica. Por otra parte, en pacientes vacunados con PPV23 se determinó que aquellos > 65 años generaban una cantidad de Igs anti-capsulares similares a la producida por adultos < 45 años, sin embargo, las Igs producidas en el primer caso eran menos funcionales, ya que presentaban baja capacidad de opsonización y escasa efectividad (Schenkein *et al.*, 2008). La vacunación con PPV23 tampoco redujo el estado de portador (Overturf, 2000).

El otro grupo de vacunas que se ha comercializado con el fin de subsanar las limitaciones que presenta la PPV23 es el de las PCVs. Este tipo de vacunas incluyen polisacáridos capsulares purificados de distintos serotipos de *S. pneumoniae* conjugados covalentemente con un toxoide (variantes no tóxicas de toxinas como la diftérica, conocida como CRM197, o la proteína D de *Haemophilus influenzae*). La conjugación de polisacáridos capsulares con un toxoide, que hace las veces de proteína transportadora, activa la respuesta dependiente de L_T de anticuerpos, lo que da lugar a una protección más eficaz y a memoria inmunológica, por lo que este tipo de vacunas sí están indicadas en población pediátrica.

En el año 2000 en EEUU, y en el año 2001 en España, fue aprobada la primera PCV indicada en niños menores de 2 años y en niños mayores con riesgo de sufrir ENI (ACIP, 2000). Esta vacuna únicamente contenía polisacáridos de los 7 serotipos (PCV7)

más prevalentes en países desarrollados: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En un estudio multicéntrico con niños < 2 años que presentaban ENI, se observó un 77% menos de casos por serotipos incluidos en la PCV7 en 2002 en comparación con la media del número de casos en este grupo entre 1994 y 2000 (Kaplan *et al.*, 2004). Un análisis de las cohortes de niños nacidos en los años 2000 y 2001 mostró una reducción de hasta un 33% de los casos de otitis media en niños < 2 años y un 23% menos de casos de colocación de sondas de timpanostomía (Poehling *et al.*, 2007). Hay evidencias de que la PCV7 reduce el estado de portador nasofaríngeo de serotipos de neumococo incluidos en la vacuna (Pelton *et al.*, 2004). Sin embargo, uno de los problemas que surgió tras la implantación de la PCV7 fue que serotipos no incluidos en la vacuna comenzaron a emerger (Pilishvili *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011). Concretamente el incremento del serotipo 19A fue el más notable a nivel mundial, el cual además se asocia a una elevada tasa de resistencias (Dagan, 2009).

El reemplazamiento de serotipos hizo necesario la producción de nuevas vacunas con un espectro de protección mayor. La PCV 10 valente (PCV10) fue aprobada en 2009 e incorporaba adicionalmente los serotipos 1, 5, y 7F, mientras que la PCV 13 valente (PCV13) fue aprobada en 2010 y añadía además los serotipos 3, 6A y 19A. Sin embargo, la PCV13 ha sido aceptada más ampliamente. En España está incluida en el calendario vacunal pediátrico de todas las comunidades autónomas desde 2016. En adultos está aprobado también su uso en la Comunidad Autónoma de Madrid para la cohorte de 60 años y en la Comunidad Autónoma de Castilla y León para la cohorte de 65 años. Esto es debido a que se ha demostrado que dicha vacuna produce una RI funcional mayor que PPV23 en adultos de entre 60 y 64 años no vacunados previamente (Jackson *et al.*, 2013). Al igual que se ha descrito para la PCV7, un aspecto de la vacunación con la PCV13 que necesita ser destacado es la posibilidad de infecciones por reemplazo de serotipos que no están presentes en la vacuna y causan EN (Weinberger *et al.*, 2011; Feikin *et al.*, 2013; Aguinagalde, 2015). En esta línea se encuentran los datos recogidos por el Laboratorio de Referencia de Neumococos del Centro Nacional de Microbiología (CNM) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Figura 4).

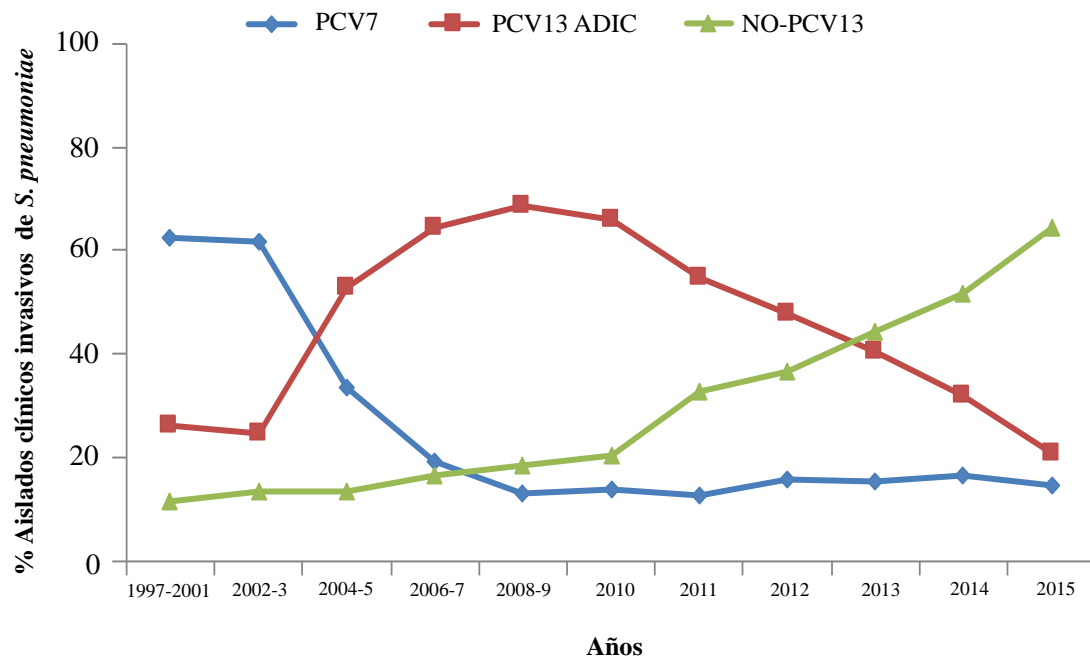


Figura 4. Porcentaje de aislados clínicos invasivos de *S. pneumoniae* agrupados en función de la distribución de los distintos serotipos presentes en las vacunas comercializadas recibidos en el Laboratorio de Referencia de Neumococos (CNM, ISCIII) del año 1997 al 2015. PCV7: serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F; PCV13 ADIC: serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F; NO-PCV13: serotipos no incluidos en PCV13. Datos cedidos por la Dra. Asunción Fenoll.

Además, la eficacia de la PCV13 frente al serotipo 3 no queda resuelta. Esto es debido en parte a que este serotipo libera fragmentos de su cápsula durante su crecimiento reduciendo la protección mediada por los anticuerpos capsulares anti-serotipo 3 (Choi, 2016). Concretamente, en el ensayo POET se ha visto que la vacunación no protege frente a la otitis media producida por el serotipo 3, la explicación a este hecho es múltiple: (1) inducción de una memoria inmunitaria incompleta por parte de la vacuna; (2) falta de accesibilidad de los anticuerpos protectores por el grosor de la cápsula de este serotipo en oído medio; y (3) aparición de formas acapsulares durante la formación de biopelícula (Poolman *et al.*, 2009).

2.3. Potenciales proteínas candidatas a vacunas

Según lo comentado anteriormente, las principales desventajas de las vacunas neumocócicas actuales son:

- El reemplazo de serotipos incluidos en la vacuna por los no incluidos a la hora de producir no solo infecciones, sino también colonización. A este respecto habría que resaltar la existencia de cepas resistentes a penicilina que han sufrido cambio

capsular, lo que implicaría una infección por cepas más resistentes a antibióticos (Wyres *et al.*, 2013).

- La limitada protección frente al serotipo 3 incluido en las vacunas, posiblemente debido a la intransigencia de este serotipo y/o deficiencias de los procedimientos de conjugación usados en la producción de las vacunas (Ginsburg y Alderson, 2011).
- El impacto trivial en serotipos no incluidos en la vacuna que colonizan nasofaringe, lo que da lugar a una menor inmunidad de grupo (Millar, 2006).
- La exclusión de factores genómicos distintos de la cápsula que pueden modular la virulencia (Thomas *et al.*, 2011).
- La inducción variable de inmunidad en mucosas y de protección frente al desarrollo de otitis media aguda. Esto es debido a la ausencia de epítomos proteicos de neumococo que activan la RI mediada por células Th1 y Th17 (Moffitt y Malley, 2011).

En base a las limitaciones comentadas, los esfuerzos actuales están encaminados al desarrollo de una vacuna que sea altamente eficaz y serotipo-independiente, de modo que proporcione protección frente a la infección neumocócica producida por cualquier aislado clínico. Una estrategia apunta al uso de antígenos proteicos comunes a todos los serotipos. Una vacuna de este tipo sería beneficiosa, ya que las proteínas son antígenos T-dependientes y, por lo tanto, conferirían una alta inmunogenicidad y memoria inmunológica en niños. Se evita así la conjugación a un toxoide, que encarece la formulación final al ser un paso tecnológicamente costoso. Además, las proteínas pueden ser producidas en grandes cantidades mediante tecnologías de ADN recombinante a un precio relativamente bajo y su formulación como vacuna es simple. Por otra parte, un antígeno proteico altamente eficaz podría también ser usado como transportador en una vacuna conjugada polisacáridica, de este modo sería necesaria solo la conjugación de unos pocos polisacáridos para conseguir aumentar la protección. La vacunación mediante polisacáridos capsulares y proteínas neumocócicas podría presentar, por ello, un carácter sinérgico. Y si además, estos antígenos proteicos se localizan en la superficie bacteriana, existe una alta probabilidad de que sean reconocidos por anticuerpos de la RIA, generados tras una exposición previa en la vacunación. Por último, si estas proteínas de superficie son factores de virulencia que se expresan en diferentes fases del proceso infeccioso contribuyendo a la patogénesis de la bacteria, se podría neutralizar la infección en cualquiera de sus estadios. Es, por tanto,

importante conocer de forma detallada la función que desempeña cada una de ellas. De esta manera se podría entender mejor como se confiere la protección. Por eso, los candidatos a vacunas ideales deben estar presentes en la superficie de la bacteria, expresarse de manera importante durante todos los estadios de la infección y estar altamente conservados en todos los serotipos (Grandi, 2001).

Hasta la fecha, varias proteínas o fragmentos de éstas han sido evaluados como componentes únicos o formando parte de combinados vacunales. Las más relevantes se describen a continuación.

2.3.1. Neumolisina

Fue la primera proteína de neumococo propuesta como antígeno vacunal cuando se demostró que la inmunización de ratones con la toxina purificada inducía protección frente a infección intranasal (IN) por cepas virulentas de neumococo (Paton *et al.*, 1983). Sin embargo, la neumolisina nativa no es aceptable en humanos por su toxicidad, por lo que se han introducido mutaciones para eliminar su actividad citotóxica y de activación del sistema del complemento. Estos toxoides denominados neumolisoides no son tóxicos, pero sí inmunogénicos, protectores y fácilmente purificables en *Escherichia coli* mediante técnicas de biología molecular recombinante (Mann *et al.*, 2014). La neumolisina es una proteína muy conservada en los distintos serotipos de *S. pneumoniae* lo cual augura una amplia cobertura de todas las cepas. Sin embargo, los neumolisoides no proporcionan un grado de protección suficiente de manera aislada frente a los serotipos incluidos en una vacuna, por lo que éstos pueden combinarse con proteínas de superficie, PspA y PspC, que induzcan la producción de anticuerpos opsonizantes aumentando su grado de protección (Ogunniyi *et al.*, 2007).

2.3.2. Proteínas de unión a colina

Estas SPs son consideradas como prometedores antígenos vacunales por encontrarse en la mayoría de los aislados, como es el caso de LytA (Morales *et al.*, 2015) y PspA (Hollingshead *et al.*, 2006). El hecho de que algunas de ellas, por ejemplo PspA y PspC, presenten una elevada variabilidad alélica, se contrarresta con el hecho de que la inmunización con estas proteínas da lugar a una reactividad cruzada (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Briles *et al.*, 2000). Por otra parte, los buenos resultados obtenidos en ensayos de inmunoprotección con LytB y PcpA en modelos murinos de sepsis y

neumonía (Glover *et al.*, 2008; Corsini *et al.*, 2016), señalan a las CBPs como potenciales antígenos vacunales.

2.3.3. Lipoproteínas

De este grupo las que se presentan como candidatas importantes a formar parte de una vacuna proteica frente a *S. pneumoniae* son PsaA, PiuA/PiaA y PotD, ya que las tres se encuentran altamente conservadas en neumococo (Sampson *et al.*, 1997; Ware *et al.*, 2006). En el caso de PsaA un hándicap es encontrarse presente en otras especies bacterianas (Jado *et al.*, 2001). La protección obtenida mediante inmunización pasiva con PiuA/PiaA y PotD en modelos animales confirma la efectividad de los anticuerpos que generan (Brown *et al.*, 2001; Shah y Swiatlo, 2006).

2.3.4. Proteínas LPxTG

Entre estas proteínas de anclaje a pared destacan NanA y ZmpA como antígenos vacunales por su implicación en patogénesis a distintos niveles, lo que justifica su protección en modelos animales de colonización (Tong *et al.*, 2005), otitis media (Long *et al.*, 2004), neumonía (Audouy *et al.*, 2007) y sepsis (Lock *et al.*, 1988). Aunque también se ha demostrado la eficacia de RrgA en ENI (Moschioni *et al.*, 2012), el bajo nivel de distribución de PI-1 en aislados clínicos de neumococo sugiere que esta proteína solo debería ser considerada en el desarrollo de una vacuna proteica multivalente (Nelson *et al.*, 2007a; Hilleringmann *et al.*, 2008).

2.3.5. Familia de proteínas Pht

Análisis genotípicos y fenotípicos muestran que los genes *pht* y sus correspondientes productos están altamente conservados entre serotipos (Hamel *et al.*, 2004) (Rioux *et al.*, 2011). PhtD es de toda la familia el candidato a vacuna más prometedor debido a que presenta una eficacia protectora superior frente a la colonización por su alto nivel de conservación de secuencia (Rioux *et al.*, 2011; Godfroid *et al.*, 2011), y por su efecto protector aditivo cuando se administra con polisacáridos capsulares (Denoel *et al.*, 2011).

Además de vacunas constituidas por proteínas aisladas, se ha propuesto la alternativa de producir vacunas que incluyan la célula completa no capsulada atenuada o inactiva de neumococo. Este tipo de vacunas inactivadas se ha administrado intranasalmente con un adyuvante de mucosas obteniéndose la prevención de la colonización nasofaríngea

en ratones y la protección frente a ENI en ratas (Malley *et al.*, 2001). De igual modo, la administración IN o intraperitoneal (IP) de neumococos atenuados proporcionó una protección amplia en mucosas y anticuerpos sistémicos en ratones infectados posteriormente con neumococo (Roche *et al.*, 2007). Este tipo de vacunas contienen un gran número de antígenos proteicos expuestos en la superficie, lo que induce una respuesta de anticuerpos y células T a diferentes antígenos de manera que potencia la cobertura a distintas cepas. Sin embargo, a pesar de esto, la vacunación con cepas de *S. pneumoniae* atenuadas no necesariamente induce una RI cruzada frente a cepas heterólogas por razones desconocidas (Chimalapati *et al.*, 2011). Desde el punto de vista comercial, aunque la vacuna de neumococo completa es barata de producir, tiene muchas desventajas por su complejidad antigénica y por el reto de la reproducibilidad exigible para su licencia.

2.4. Nuevas vacunas incluidas en ensayos clínicos

Algunas de las opciones comentadas anteriormente están incluidas en estudios preclínicos y clínicos tempranos (Tabla 1) (Feldman y Anderson, 2014).

Tabla 1. Vacunas de nueva generación.

Vacuna	Proteínas incluidas	Sertotipos incluidos	Fase de ensayo
Conjugada 15 valente	CRM197	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F	I/II
Conjugada 8 valente	CRM y neumolisina D1	Amplia cobertura	I/II
Conjugada 10 valente + difteria y tétanos	Proteína D, toxoides diftérico y tetánico, neumolisina D1 y PhtD	Amplia cobertura	I/II
Basada en 1 proteína	PcpA	Amplia cobertura	I
Basada en 2 proteínas	PcpA y PhtD	Amplia cobertura	I
Basada en 3 proteínas	PcpA, PhtD y neumolisina D1	Amplia cobertura	I
Basada en 1 proteína	Neumolisina D1	Amplia cobertura	I
Basada en 3 proteínas	Proteína D, neumolisina D1 y PhtD	Amplia cobertura	I
Basada en 1 proteína	PhtD	Amplia cobertura	I/II
Bacteria completa atenuada	Célula entera	Amplia cobertura	I

II. OBJETIVOS

Considerando que los mecanismos que gobiernan la transición de *S. pneumoniae* entre los estados de comensal y patógeno son hasta el momento relativamente desconocidos, y las limitaciones asociadas a las actuales vacunas frente a este microorganismo, los objetivos experimentales planteados en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Analizar las características genéticas, genómicas y proteicas esenciales de la proteína DiiA de *S. pneumoniae*.
2. Estudiar la relación entre la variabilidad alélica de DiiA y el perfil epidemiológico de *S. pneumoniae*.
3. Justificar la relevancia de DiiA en la enfermedad neumocócica utilizando modelos murinos y abordajes *in vitro*.
4. Caracterizar la respuesta inmunogénica inducida por DiiA.
5. Evaluar la capacidad inmunoprotectora de DiiA frente a colonización, neumonía invasiva y sepsis neumocócicas en modelos murinos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se detallan en las Tablas 2 a 5.

Tabla 2. Cepas bacterianas de *S. pneumoniae* utilizadas o generadas en esta Tesis Doctoral.

Cepa	Descripción ^a	Referencia
TIGR4 ^b	Serotipo 4	Hyams <i>et al.</i> , 2010
TIGR4-R1R2	TIGR4, con gen <i>diiA</i> invertido; CHL ^R	Esta Tesis
TIGR4-R2	TIGR4, delección en residuos 11-93 en <i>diiA</i> invertido; CHL ^R	Esta Tesis
TIGR4-NR	TIGR4, delección en residuos 11-199 de <i>diiA</i> invertido; CHL ^R	Esta Tesis
TIGR4Δ <i>diiA</i>	TIGR4, <i>diiA::cat</i> ; CHL ^R	Esta Tesis
TIGR4Δ <i>pspA</i>	TIGR4, <i>pspA::aphIII^c</i> ; KAN ^R	Esta Tesis
TIGR4Δ <i>diiA</i> <i>pspA</i>	TIGR4, <i>diiA::cat</i> , <i>pspA::aphIII^c</i> ; CHL ^R , KAN ^R	Esta Tesis
D39	Serotipo 2	Lanie <i>et al.</i> , 2007
48	Serotipo 23F	Corsini <i>et al.</i> , 2016
957	Serotipo 3	Corsini <i>et al.</i> , 2016

^aCHL, cloranfenicol; KAN, kanamicina; R, resistente.

^bCepa ATCC BAA-334, obsequio del Prof. Jeremy S. Brown (University College Medical School, Rayne Institute, London, United Kingdom).

^cADN obsequio del Dr. Ernesto García (Centro de Investigaciones Biológicas, Centro Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España).

Tabla 3. Cepas bacterianas no neumocócicas utilizadas en esta Tesis.

Bacteria	Cepa	Referencia/Origen
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	IS7493	Shihanas <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptococcus mitis</i>	SK569	Identificador BioSample: SAMN00621701
<i>S. pyogenes</i>	M49	McSchan <i>et al.</i> , 2008
<i>S. agalactiae</i>	NEM316	Glasser <i>et al.</i> , 2002
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3) CodonPlus	GE Healthcare
<i>E. coli</i>	XL1-blue	GE Healthcare

Además, se estudiaron un total de 560 aislados consecutivos de *S. pneumoniae* causantes de ENI y ENNI procedentes de pacientes adultos (71.3% varones y media de edad 66 ± 16) ingresados en el Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona) entre 2009 y 2011. Los aislados invasivos se obtuvieron de sangre (65.2% con foco pulmonar

confirmado mediante radiología), mientras que las cepas no invasivas se aislaron de muestras de esputo adecuadamente recogidas. De estas últimas, el 42.5% procedían de pacientes con EA-EPOC, el resto de pacientes con cuadro de neumonía. En estas cepas la serotipificación se llevó a cabo por *dot blot*, reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*) o mediante reacción de Quellung en el Laboratorio de Referencia de Neumococos del CNM del ISCIII (Tarrago *et al.*, 2008). Se determinaron como serotipos mayoritarios aquellos que se encontraron en ≥ 10 aislados clínicos. La tipificación molecular se realizó mediante electroforesis en gel de campo pulsado sobre muestras digeridas con *SmaI* en el Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona). Los modelos de bandas se compararon visualmente para determinar los genotipos principales descritos. Al menos un aislado de cada genotipo principal se sometió a MLST. La detección del tipo de alelo de *DiiA* se llevó a cabo mediante PCR utilizando los oligonucleótidos SP1992F y SP1992R (Tabla 5). Los productos de PCR de los aislados representativos de los complejos clonales más abundantes fueron verificados por secuenciación completa. Los complejos clonales mayoritarios se definieron como aquellos que incluían ≥ 10 aislados clínicos.

Tabla 4. Lista de plásmidos utilizados en esta Tesis.

Nombre	Descripción ^a	Referencia/Origen
pJS3	Vector de expresión, CHL ^R	Ballester <i>et al.</i> , 1986
pET28	Vector de expresión con <i>tag</i> de histidinas en posición N-terminal, KAN ^R	Novagen
pET28-cat	Vector de expresión con <i>tag</i> de histidinas en posición N-terminal, KAN ^R , CHL ^R	Esta Tesis
pET28-cat- <i>diiA</i> -R1R2	Vector de expresión con <i>tag</i> de histidinas en posición N-terminal, KAN ^R , CHL ^R , <i>diiA</i> -R1R2	Esta Tesis
pET28-cat- <i>diiA</i> -R2	Vector de expresión con <i>tag</i> de histidinas en posición N-terminal, KAN ^R , CHL ^R , <i>diiA</i> -R2	Esta Tesis
pET28-cat- <i>diiA</i> -NR	Vector de expresión con <i>tag</i> de histidinas en posición N-terminal, KAN ^R , CHL ^R , <i>diiA</i> -NR	Esta Tesis
pUC57- <i>diiA</i> -R2	Vector de expresión, AMP ^R , <i>diiA</i> -R2	GenScript
pUC57- <i>diiA</i> -NR	Vector de expresión, AMP ^R , <i>diiA</i> -NR	GenScript

^aAMP, ampicilina, CHL, cloranfenicol; KAN, kanamicina; R, resistente.

Tabla 5. Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia 5'→3' ^a	Localización ^b
CATUP_SI	GCGC <u>GTCGACC</u> ACCCATTAGTTCAACAAACG	146-166 (5')
CATDOWN_Sc	GCGC <u>GAGCTC</u> GAAGGATATGGATCTGGAGCTG	87-108 (3')
SP1992_U_SI	GCGC <u>GTCGAC</u> GCATAATCCAAACGAATTCTATC	168-190 (5')
SP1992_D_No	GCGC <u>GCGGCCG</u> CCTTCTAACCTCGTTTTCTATCTTC	286-309 (3')
SP1992_UR_Sc	GCGC <u>GAGCTC</u> AGATGATTTTTGATACACATAC	310-331 (3')
spr1806_ExF_C	GGAAATGGTCAGACCTTCTGG	3157-3177 (3')
SP1992_DF_No	GCGC <u>GCGGCCG</u> CAGCCAAAACCTTTGCGTCCTTTACG	191-214 (5')
spr1806_ExR_C	GGCAGCAGGTAAAGTAGCCAAG	3077-3098 (5')
SP1992F	GTTATTATTTTATTTTACTATAAAAGTTG	1-28 (-)
SP1992R	CTATTTTCTACGTCTAGTC	975- 993 (-)
SP1992_8_NIF	GCGC <u>CATATG</u> AAAGTTGAAGTAGGTGGAGATGG	22-45 (-)
SP1992_274_BIR	GCGC <u>GGATCC</u> CCTAACTTGTTGTCTTAGGAGCAGC	802-822 (-)

^aLas dianas de restricción están marcadas en negrita y subrayadas.

^b -, secuencia codificante.

2. MEDIOS, CONDICIONES Y CONSERVACIÓN DE CULTIVOS

Las cepas de *S. pneumoniae* se cultivaron a 37°C en medio Todd-Hewitt (Oxoid) con extracto de levadura al 0.5% (Oxoid) (THY: *Todd-Hewitt yeast extract*) y 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich). El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría (DO₅₅₀) con el espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20. Las cepas se conservaron congeladas a -80°C en el medio empleado al que se añadió glicerol (Scharlau) a una concentración final de 10% (v/v). Además, estas cepas se cultivaron en placas comerciales de agar sangre constituidas por Mueller Hinton Agar con 5% de sangre de oveja (Becton Dickinson) o en placas preparadas manualmente con Mueller Hinton Agar (Scharlau) suplementado con 5% de sangre de oveja (Thermo Scientific) y los antibióticos correspondientes (cloranfenicol: 2.5 µg/ml; kanamicina: 250 µg/ml) (Sigma-Aldrich), en estos casos se incubaron a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C en agitación a 200 rpm en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook, 1989) con 50 µg/ml de kanamicina (Sigma-Aldrich). El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría (DO₆₀₀) con un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201. Se conservaron congeladas a -80°C en el medio empleado al que se añadió glicerol a una concentración final de 25% (v/v). Además estas cepas se cultivaron en placa empleando el medio LB con 1% de agar a 37°C.

3. REACTIVOS, PRODUCTOS, ANTICUERPOS Y SUERO HUMANO

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por las casas comerciales Difco, Oxoid, Pronadisa, Scharlau, Sigma-Aldrich, Merck y Becton Dickinson. La agarosa fue suministrada por Pronadisa. Se empleó seroalbúmina bovina (BSA: *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich) que se preparó al 10% (peso/volumen) en agua a pH 7.5. Los antibióticos, así como los compuestos HCl, azul brillante de Coomassie, azul de bromofenol, azul tripán, β -mercaptoetanol, NaCl, DNAsa I, dodecil sulfato sódico (SDS: *sodium dodecyl sulphate*), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*), glicerol, imidazol, isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), leupeptina, lisozima, o-fenildiamina (OPD: *ortho-phenylenediamine*), paraformaldehído (PFA: *para-formaldehyde*) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Merck y Bio-Rad. Para los cultivos celulares se empleó el medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) con rojo fenol (Invitrogen), glutamina al (Invitrogen) y una combinación comercial de penicilina 10000 U/ml con estreptomicina 10000 U/ml (Invitrogen).

El péptido estimulador de la competencia (CSP: *competence stimulator peptide*) CSP-2 (EMRISRIILDFLFLRKK) (Coleman *et al.*, 2011) fue sintetizado por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Los biomoléculas y anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 6 y Tabla 7, respectivamente.

Tabla 6. Biomoléculas utilizadas.

Compuesto ^a	Origen	Referencia
aLf de leche humana	Sigma-Aldrich	L0520
BSA	Sigma-Aldrich	A7030
Clg de pulmón humano	Sigma-Aldrich	C5983
CnA de tiburón	Sigma-Aldrich	C4384
CnB de cerdo	Sigma-Aldrich	C3788
CRP humana	Merck	236608
El de pulmón humano	Merck	324751
FH humano	Merck	341274
Fn de plasma humano	Merck	341635
hLf de leche humana	Sigma-Aldrich	L3770
Lm de ratón	Sigma-Aldrich	L2020
Mc bovina	Sigma-Aldrich	M3895
Pl de plasma humano	Sigma-Aldrich	P7999

^a Apolactoferrina, aLf; Colágeno, Clg; Condroitín sulfato A, CnA; Condroitín sulfato B, CnB; Proteína C-reactiva CRP; Elastina, El; factor H, FH; Fibronectina, Fn; Hololactoferrina, hLf; Laminina, Lm; Mucina de glándula submaxilar, Mc; Plasminógeno, Pl.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados.

Nomenclatura	Descripción ^a	Excitación/Emisión	Origen
Anti-C3b de humano	Anticuerpo de cabra anti-C3b humano conjugado con FITC	495/519	Cappel (MP Biomedicals)
Anti-C3b de ratón	Anticuerpo de cabra anti-C3b de ratón conjugado con FITC	495/519	Cappel (MP Biomedicals)
Anti-IgG de ratón	Anticuerpo de conejo anti-IgG totales de ratón conjugado con FITC	495/519	Southern Biotech
Anti-IgG totales de ratón	Anticuerpo de cabra anti-IgG totales de ratón conjugado con HRP	NA	Southern Biotech
Anti-IgG1 de ratón	Anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con HRP	NA	Southern Biotech
Anti-IgG2a de ratón	Anticuerpo de cabra anti-IgG2a de ratón conjugado con HRP	NA	Southern Biotech
Anti-IgG2b de ratón	Anticuerpo de cabra anti-IgG2b de ratón conjugado con HRP	NA	Southern Biotech
Anti-IgG3 de ratón	Anticuerpo de cabra anti-IgG3 de ratón conjugado con HRP	NA	Southern Biotech
Anti-IgA de ratón	Anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón conjugado con HRP	NA	Southern Biotech
Anti-CD3 de ratón	Anticuerpo de hámster armenio anti-CD3 de ratón conjugado con PE	565/573	Tonbo
Anti-CD4 de ratón	Anticuerpo de rata anti-CD4 de ratón conjugado con FITC	495/519	Biolegend
Anti-CD8 de ratón	Anticuerpo de rata anti-CD8 de ratón conjugado con PE	565/573	Tonbo

^aFITC, isotiocianato de fluoresceína; HRP, Horseredish peroxidase; PE, ficoeritrina; NA, No aplicable.

Las muestras de suero humano fueron obtenidas de sangre procedente de voluntarios sanos (media: 30 años \pm 6), no vacunados frente a *S. pneumoniae* y de acuerdo con las directrices institucionales.

4. TÉCNICAS DE ADN

4.1. Extracción de ADN cromosómico

El ADN cromosómico de *S. pneumoniae* se extrajo mediante DNeasy Blood and Tissue Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Se sembró una placa de la cepa correspondiente en agar sangre y tras

18 h de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ se recogió con un asa estéril la bacteria crecida. Ésta se mezcló con 200 µl de medio Morrison (TrisHCl 50 mM, EDTA 30 mM, Sarkosyl al 0.4% y Triton X-100 al 0.1% a pH 8.0) (Morrison, 1978) y se incubó 1 h a 37°C. A continuación, se añadieron 50 µl de tampón AL y 20 µl de proteinasa K (Roche) y se incubó durante 2 h a 56°C. Posteriormente, se añadieron 150 µl de tampón AL y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Entonces, se añadieron 250 µl de etanol absoluto (Panreac), se mezcló por inversión repetida y se pasó todo el contenido a una columna que se centrifugó a 5900 x g durante 1 min, de manera que el ADN quedó retenido en la matriz de la columna. La columna se lavó primero con 500 µl de Buffer AW1 a 5900 x g durante 1 min y después con 500 µl de tampón AW2 a 16100 x g durante 4 min. Por último, el ADN se eluyó con 120 µl de tampón AE a 5900 x g durante 1 min. La concentración del ADN extraído se cuantificó mediante QuantiFluor[®] dsDNA System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante en el aparato Quantus[™] Fluorometer (Promega).

4.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Para llevar a cabo una amplificación de fragmentos de ADN se empleó el equipo GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems) y la ADN polimerasa EconoTaq PLUS 2X Master Mixes (Lucigen) según las instrucciones del fabricante. Las condiciones de la reacción de amplificación de los genes a partir de ADN cromosómico o plasmídico fueron las estándar: una fase previa de calentamiento a 94°C durante 12 min, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 50°C y 2 min a 72°C durante 2 min y, por último, un paso adicional de elongación a 72°C durante 10 min.

4.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa (Pronadisa) al 1% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM a pH 8.1), utilizando el mismo tampón para el desarrollo de la electroforesis. Se añadió 1 µL de tampón de carga de ADN 6x (Thermo Scientific) a cada 5 µL de muestra. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 30 min y, una vez finalizada, el ADN se marcó con bromuro de etidio (Sigma) durante 20 min y se visualizó con radiación ultravioleta a 302 nm. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron GeneRuler 100 bp y GeneRuler 50 bp DNA (Thermo Fisher Scientific). Las cepas TIGR4 y D39 se utilizaron como controles del alelo largo (993 pares de bases) y alelo corto (744 pares de bases), respectivamente.

4.4. Manipulación del ADN con enzimas de uso común en biología molecular

Las endonucleasas de restricción y la ADN ligasa se obtuvieron de Thermo Scientific. Las enzimas y sus tampones correspondientes se utilizaron siguiendo las indicaciones recomendadas por las respectivas casas comerciales. Brevemente, *Sall*, *SacI*, *NotI*, *NedI* y *BamHI* se incubaron durante la noche a 37°C en presencia de fragmentos de ADN amplificados por PCR y plásmidos. Posteriormente, se inactivaron por calor a 65°C durante 10 min. La ligasa se incubó con los productos de cada digestión durante 15 min a 15°C.

4.5. Secuenciación de ADN

A partir del material genético amplificado por PCR se llevó a cabo la secuenciación del mismo utilizando un secuenciador automático modelo ABI 3730XL (Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación del CNM (ISCIH). Para la reacción de secuenciación se utilizó el BIGDYE 3.0 Kit (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones de los proveedores.

5. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES ISOGÉNICOS EN TIGR4

5.1. Construcción de mutantes en el gen *diiA*

El cassette P_{iccat} , que contiene la región codificante del gen *cat* (acetiltransferasa de cloranfenicol) junto a su promotor y terminador, fue amplificado a partir del plásmido pJS3 utilizando los oligonucleótidos CUTUP_SI y CATDOWN_Sc. El producto de PCR fue digerido con *Sall* y *SacI* (dianas incluidas en los cebadores) y ligado al plásmido pET28, cortado con las mismas enzimas, para generar el plásmido pET28-cat.

Los fragmentos de *diiA* llamados *diiA*-R2 (con una deleción entre los residuos 11 y 93) y *diiA*-NR (con una deleción entre los residuos 11 y 129) fueron sintetizados y clonados en el plásmido pUC57 por GenScript, dando lugar a los plásmidos pUC57-*diiA*-R2 y pUC57-*diiA*-NR.

Las tres versiones de *diiA*: *diiA*-R1R2, *diiA*-R2 y *diiA*-NR fueron amplificadas a partir del genoma de la cepa TIGR4, pUC57-*diiA*-R2 y pUC57-*diiA*-NR, respectivamente, usando los cebadores SP1992_U_S1 y SP1992_D_No. Los productos de la PCR fueron digeridos con *Sall* y *NotI* y ligados al plásmido pET28-cat, el cual había sido previamente digerido con las mismas enzimas. De este modo se obtuvieron los plásmidos pET28-cat derivados que presentan las tres versiones de *diiA*. Para

insertar estas versiones de *diiA* en el cromosoma de TIGR4 se llevó a cabo una transformación con ligación a tres bandas. Primero los amplicones que contenían tanto una versión del gen *diiA*, como el cassette $P_{tc}cat$ fueron obtenidos utilizando los oligonucleótidos CATDOWN_Sc y SP1992_D_No, y el correspondiente plásmido pET28-cat derivado como modelo. Estos amplicones fueron digeridos con *ScaI* y *NotI*, y ligados a dos fragmentos de PCR que flanquean el gen *diiA* de TIGR4. Estos fragmentos flanqueantes fueron amplificados a partir del DNA genómico de TIGR4 utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos: SP1992_UR_Sc/spr1806_ExF_C y SP1992_DF_No/ spr1806_ExR_C, y digeridos con *ScaI* y *NotI*, respectivamente.

Los productos de la ligación fueron insertados en el cromosoma de TIGR4 mediante recombinación doble por transformación de células de TIGR4 como se ha descrito previamente (Acebo *et al.*, 2012) utilizando el CSP-2. La estructura genética correcta de las cuatro construcciones fue verificada por PCR y secuenciación en el Servicio de Secuenciación del CNM (ISCIH). Los oligonucleótidos utilizados en este apartado se describen en la Tabla 4.

5.2. Construcción de mutantes en el gen *pspA*

Para la construcción de cada mutante se partió de un cultivo de la cepa correspondiente crecido en placa durante 18 h a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂. De este cultivo se inocularon entre 3 y 5 colonias en 5 ml de THY a pH 6.8 y el medio se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO₅₅₀ ~ 0.015. Este proceso se realizó para cada cepa en tres tubos simultáneamente. Se mezcló el contenido de los 3 tubos y se homogenizó para posteriormente ser repartido en 10 viales de 1.5 ml. Estos fueron centrifugados a 16100 x g durante 10 min a 4°C. El sedimento de 8 viales se resuspendió en 900 µl de THY a pH 8.0, 100 µl de CaCl₂ 10 mM, 20 µl de BSA al 10% y 2 µl de CPS-2. Posteriormente se añadió a la mezcla 3 µl de ADN donador (*pspA::aphIII*; CMI: kanamicina 250 µg/ml) (Moscoso *et al.* 2006). El sedimento de los 2 viales restantes se resuspendió en 900 µl de THY a pH 8.0, 100 µl de CaCl₂ 10 mM, 20 µl de BSA al 10% y 2 µl de CPS-2, pero no se le añadió ADN donar, actuando así como control. Las mezclas se incubaron durante 2 h a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se sembró cada cultivo en 2 o 3 placas con y sin antibiótico durante 24 h a 37°C al 5% CO₂. Las colonias crecidas únicamente en las placas con antibiótico se identificaron como los mutantes buscados.

Se partió de las cepas TIGR4 y TIGR4 Δ diiA para obtener, respectivamente, los mutantes TIGR4 Δ pspA y TIGR4 Δ diiApspA. La cepa TIGR4 Δ pspA se obtuvo de placas con 250 μ g/ml de kanamicina y la cepa TIGR4 Δ diiApspA de placas con 2.5 μ g/ml de cloranfenicol y 250 μ g/ml de kanamicina.

6. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *E. COLI*

Se clonaron distintas variantes del gen *diiA* para su inducción heteróloga en *E. coli*. Para ello, se amplificaron fragmentos del genoma de TIGR4, de pUC57-*diiA*-R2 y de pUC57-*diiA*-NR utilizando los oligonucleótidos SP1992_8_N1F y SP1992_274_B1R (Tabla 5). Todos los fragmentos fueron digeridos con *NheI* y *BamHI* y clonados en el plásmido pET28 cortado con las mismas enzimas. Los productos de ligación se transfirieron mediante transformación por choque térmico (90 s en baño a 42°C) a la cepa competente *E. coli* XL1-blue (GE Healthcare). Las construcciones se verificaron por secuenciación completa. Los plásmidos verificados se transfirieron mediante transformación por choque térmico a la cepa competente de *E. coli* BL21 (DE3) (GE Healthcare), que es una cepa diseñada para la expresión proteica heteróloga de genes con perfil de uso de codones distinto a *E. coli*.

7. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS

7.1. Producción de las variantes recombinantes de la proteína DiiA

Se cultivaron las variantes clonadas en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) a partir de una colonia en 50 ml de medio LB con 50 μ g/ml de kanamicina durante toda la noche. Posteriormente, el cultivo se diluyó 1:100 en 3 l del mismo medio. La inducción de los genes de las variantes de DiiA se llevó a cabo cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ ~ 0.6 mediante la adición de IPTG 0.5 mM (Sigma-Aldrich) e incubación posterior durante 3 h. El cultivo final se enfrió en hielo durante 15 min, se centrifugó a 8500 x g durante 15 min a 4°C y el sedimento se resuspendió en 15 ml de tampón A (NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 8.0) por cada litro de cultivo inducido y unidad de DO₆₀₀. Los lisados se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

7.2. Purificación de las variantes recombinantes de la proteína DiiA

Los lisados del apartado 7.1. se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron en hielo. Posteriormente, se les añadió 10 μ g/ml de DNasa I, 50 μ g/ml de lisozima, 2

$\mu\text{g/ml}$ de leupeptina y $200 \mu\text{g/ml}$ de PMSF. Las células de la mezcla se lisaron mediante sonicación en hielo con 6 ciclos en el sonicador Vibra-Cell 75043 (Bioblock Scientific). Cada ciclo constaba de 20 s de sonicación a una potencia del 20% y un intervalo de 1 min para evitar el sobrecalentamiento de las muestras. Posteriormente, estas muestras se centrifugaron a $100000 \times g$ durante 1 h a 4°C . Al sobrenadante de la centrifugación se le añadió $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (Sigma-Aldrich) hasta alcanzar una saturación del 40% y se agitó vigorosamente usando un agitador magnético durante 30 min a 4°C . La solución se centrifugó a $10000 \times g$ durante 15 min a 4°C . Al sobrenadante se le añadió nuevamente $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ hasta completar una saturación del 60% y se repitió el proceso de agitación y centrifugación. El sedimento se resuspendió en un volumen final de 50 ml de tampón A que contenía un 8% de tampón B (tampón A más 500 mM de imidazol). Los agregados de la muestra se eliminaron por filtración con una membrana con tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$. La solución resultante se inyectó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare) mediante el cromatógrafo ÄKTAprime plus (GE Healthcare). Las distintas variantes DiiA se unieron a la matriz de la columna a través de sus colas de histidina. Para eliminar productos con unión inespecífica, la columna se lavó con 5 volúmenes de tampón A que contenía un 8% de tampón B. Posteriormente, las proteínas unidas se eluyeron mediante la aplicación del tampón A con un gradiente entre 8% y 100% de tampón B (entre 40 mM y 500 mM de imidazol). Las fracciones eluidas que contenían las proteínas de interés se detectaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se concentraron utilizando el dispositivo de filtración Ultraprerp 10KDa (Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras concentradas se diluyeron con 10 volúmenes de tampón A HiTrap (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM a pH 7.0) y se aplicó a una columna de cromatografía iónica HiTrap HP (GE Healthcare). Las proteínas se eluyeron con el mismo tampón usando un gradiente entre 50 mM y 1 M de NaCl. Las fracciones que contenían la proteína de interés se concentraron e inyectaron a una columna de desalado HiTrap HP (GE Healthcare). Las proteínas se eluyeron con tampón que contenía NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM a pH 7.5 y se concentraron hasta 10-20 mg/ml. Las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -80°C hasta su utilización. La concentración y pureza de las preparaciones fueron estimadas por electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando geles con gradiente de 4-15% (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels) utilizando BSA como proteína control de concentración.

7.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para conocer el grado de oligomerización de las variantes purificadas de DiiA se realizaron electroforesis analíticas utilizando geles de poliacrilamida en gradiente de 4 a 15% (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels) en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS (Laemmli, 1970) o en condiciones nativas utilizando diluciones con tampón de desalado. Las muestras se hirvieron durante 5 min en presencia de un tampón constituido por Tris-HCl 62.5 mM a pH 6.8, SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. Las electroforesis se realizaron a 100 V y temperatura ambiente, utilizando un tampón que contenía Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1%. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Swank y Munkres *et al.*, 1971) durante 15 min. Posteriormente se destiñó el colorante con agua destilada en agitación durante aproximadamente 18 h. Se obtuvo una imagen del gel mediante el captador de imágenes ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). Como marcadores de masa molecular se emplearon las proteínas: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa) e inhibidor de tripsina (21.5 kDa) (Bio-Rad).

7.4. Cromatografía de filtración en gel

Las muestras con 1 mg de proteína se separaron por tamaño mediante aplicación a una columna Superdex 200 10/300 GL (Sigma-Aldrich) calibrada con el Gel Filtration Calibration Kit HMW (GE Healthcare) que incluye las siguientes proteínas: ovoalbúmina (43 KDa), conalbúmina (75 KDa), aldolasa (158 KDa), ferritina (440 KDa) y tiroglobulina (669 KDa). La proteínas se eluyeron con 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl a pH 7.5.

7.5. Western-blot

Diferentes cantidades de la proteína DiiA-R1R2 purificada se corrieron en un gel de poliacrilamida en gradiente (4-20%) y se transfirieron a una membrana PVDF utilizando el aparato Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). La membrana se bloqueó con el tampón Superblock (Thermo Fisher Scientific), se incubó durante dos horas con suero procedente de ratones inmunizados con la versión larga de la proteína DiiA diluido 1:500, se lavó y se incubó otras dos horas con proteína G conjugada a

peroxidasa (Thermo Fisher Scientific). Las bandas se revelaron tras incubar durante 5 min con el sustrato de la enzima SuperSignal West Pico Chemiluminiscent (Thermo Fisher Scientific).

7.6. Detección de la proteína DiiA

La capacidad de neumococo para expresar DiiA en condiciones *in vitro* se determinó mediante citometría de flujo. Para ello se incubaron 10 µl de PBS con 1×10^6 células de las distintas cepas de neumococo durante 2 h a 37°C en presencia de 10 µl de suero de ratón inmunizado con DiiA-R1R2. El suero fue previamente diluido 1/3 con PBS. Como control del experimento, se incubaron las cepas con 10 µl de PBS. Se llevó a cabo un lavado con PBS-TWEEN 0.1% (Sigma) y se incubaron las muestras con una dilución 1/200 del anticuerpo anti-IgG de ratón (Southern Biotech) durante 30 min en oscuridad a 4°C. Las muestras fueron lavadas de nuevo, inactivadas con 100 µl de PFA al 3% en PBS y resuspendidas en 200 µl de PBS (Ramos-Sevillano *et al.*, 2012; Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Finalmente, las muestras se analizaron en el citómetro FACS Calibur (BD Biosciences) adquiriendo 25000 eventos y midiendo la intensidad de fluorescencia. En estos ensayos los resultados fueron representados como porcentaje de células de neumococo marcadas respecto del total de bacterias analizadas (Exley *et al.*, 2005; Ramos-Sevillano *et al.*, 2012). Además, se obtuvo un histograma a modo de ejemplo representativo a partir de una de las réplicas.

8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

8.1. Estudios de secuencia

La secuencia de la proteína SP1992 (DiiA) se buscó en la base de datos unificada de secuencias proteicas UNIPROT (Consortium, 2012) mediante BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Además, esta secuencia se comparó con 18 secuencias genómicas completas de *S. pneumoniae* usando MegaBLAST (Zhang *et al.*, 2000) que optimiza la comparación de secuencias altamente similares.

8.2. Estudios genéticos

Los aspectos genéticos del gen *diiA* se analizaron mediante los siguientes protocolos:

- TransTermHP (Kingsford *et al.*, 2007): predice los terminadores de la transcripción tipo Rho-independientes. Los terminadores Rho-independientes se

caracterizan por presentar una secuencia rica en tiamina seguida de una horquilla en bucle.

- Algoritmo de Price (Price *et al.*, 2005): predice si dos genes pertenecen al mismo operon. Para ello analiza la homología de secuencia de los genes, la distancia entre éstos, la función de cada gen y el uso de codones sinónimos.
- STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017): es una base de datos de interacciones proteína-proteína conocidas y predichas. Las interacciones incluye asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales). Estas interacciones se obtienen, entre otras, a partir de co-localización en genomas, fusiones génicas, co-regulación en ensayos de transcriptómica global y subunidades de complejos.

8.3. Estudios de arquitectura de dominios

La arquitectura de la proteína se estudió computacionalmente utilizando diversos algoritmos:

- Pfam (Punta *et al.*, 2012): es una base de datos de familias de dominios proteicos y perfiles de tipo cadena oculta de Markov que permite localizar la presencia de dominios en una proteína. Los dominios Pfam se localizaron aplicando el umbral de detección recomendado por los expertos para cada familia construida.
- PSIPRED (Jones, 1999): predice la presencia de estructuras secundaria.
- Phobius (Kall *et al.*, 2004): permite estudiar la localización y orientación de proteínas, ya que predice la presencia de hélices transmembrana y de péptidos señal. Además, es capaz de discriminar entre ambos tipos de motivos a pesar ambos de similar naturaleza hidrofóbica.
- Dis-EMBL (Linding *et al.*, 2003): predice regiones desordenadas definidas como bucles/bobinas, bucles calientes y estructuras carentes de coordenadas de rayos X.
- SEG (Wootton, 1994): predice regiones de baja complejidad respecto a la composición habitual de las secuencias proteicas de aminoácidos.
- COILS (Lupas *et al.*, 1991): predice las regiones *coiled-coil* de una proteína usando una matriz MTIDK (miosina, paramiosina, troponina, filamentos intermedios I-V, proteínas de los desmosomas y quinasas); un valor umbral de 0.5, ya que a partir de este valor se incluirían estructuras *coiled-coil* de proteínas globulares, del GenBank y de secuencias generadas aleatoriamente; y una ventana de 21 residuos.

- Paircoil2 (McDonnell *et al.*, 2006): también predice regiones *coiled-coil*, pero además tiene en cuenta las secuencias incluidas en Protein Data Bank. El punto de corte que toma es $P < 0.025$ para una ventana de 21 residuos.

8.4. Estudios de antigenicidad

Para estudiar la capacidad inmunogénica de la proteína DiiA se aplicaron una batería de cinco protocolos a los 330 residuos de dicha proteína:

- BepiPred-2.0 (Larsen *et al.*, 2006): predice epítomos lineares que pueden ser reconocidos por L_B basándose en un modelo oculto de Markov.
- NetTepi (Trolle y Nielsen, 2014): es un método que integra tres tipos de predicciones afinidad de unión del péptido al MHC, estabilidad del complejo péptido-MHC y tendencia de los L_T , todas ellas encaminadas a determinar los posibles epítomos de L_T .
- SVMTriP (Yao *et al.*, 2012): predice los epítomos antigénicos lineales de L_B , pero combinando la similitud y la tendencia de tres subsecuencias peptídicas.
- IEDB analysis Resource (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input): es un servidor que predice antigenicidad basándose en hidrofilia e hidrofobicidad utilizando el algoritmo de Parker (Parker *et al.*, 1986) y el de Kolaskar y Tongaonkar (Kolaskar y Tongaonkar, 1990), respectivamente.
- OptimumAntigenTM (<http://www.genscript.com/antigen-design.html>): es una herramienta que ofrece GenScript para predecir regiones inmunogénicas mediante un consenso de criterios, calculando además su especificidad mediante comparación con proteínas incluídas en bases de datos.

9. ENSAYOS DE INTERACCIÓN CON DIFERENTES COMPONENTES DEL HOSPEDADOR

9.1. Resonancia de plasmones de superficie

La interacción entre la proteína DiiA de *S. pneumoniae* con moléculas de la matriz extracelular y del plasma sanguíneo se analizó por resonancia de plasmones de superficie (SPR, *surface plasmon resonance*) utilizando un dispositivo BIAcore X100 (GE Healthcare) según las indicaciones del fabricante. Para ello se llevó a cabo una inmovilización covalente de los grupos amino de dos versiones de la proteína DiiA (DiiA-R1R2 y DiiA-NR) en chips CM5 (GE Healthcare), en presencia de tampón

acetato 10 mM a pH 4.5. La superficie del chip fue previamente activada con una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carboamida y *N*-hidroxisuccinamida. Los ésteres del chip que quedaron libres se inactivaron mediante lavado con etanolamina 1.0 M a pH 8.5.

Inicialmente se realizó un cribado en el que se ensayó la capacidad de las siguientes moléculas para unirse a DiiA: BSA, Clg, CnA, CnB, CRP, El, FH, Fn, hLf, Lm, Mc y Pl. Todas estas proteínas se disolvieron en tampón de carga (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, surfactante P20 al 0.05% a pH 7.4) a una concentración de 100 nM y se inyectaron con un flujo de 30 µl/min a 25°C. El proceso de eliminación de los analitos unidos a la proteína DiiA (regeneración) se llevó a cabo mediante la solución que presentaba NaOH 50 mM y NaCl 1M. Esta regeneración se realizó entre cada uno de los analitos. Con las moléculas que mostraron una mayor afinidad en el primer cribado, se estimó su constante de afinidad (K_D) a DiiA con precisión mediante un ensayo de cinética. Esto implica el estudio de un gradiente de concentraciones de los analitos durante múltiples ciclos. El tiempo de contacto fue de 120 s para el Clg y 90 s para la hLf, siendo el tiempo de disociación de 210 s en ambos casos. Los datos obtenidos a partir del sistema se adaptaron a un modelo de unión 1:1 y se analizaron con el software Biacore X100 Evaluation v.2.0.1. En todos los casos se obtuvo un sensograma en el que se representan los valores de las unidades de resonancia (UR) frente al tiempo.

9.2. Depósito del complemento en presencia y ausencia de lactoferrina

Para analizar la posible interacción tripartita entre DiiA, Lf y el sistema del complemento, se incubaron 10 µL de PBS con 2.5×10^6 UFC de las distintas cepas de neumococo durante 20 min a 37°C en presencia de 10 µl de suero humano, solo o con 10 µl de aLf u hLf (Sigma) a 2, 100 y 200 µg/ml en PBS. El suero fue previamente diluido 1/5 con PBS. Como control se incubaron las cepas con 20 µl de PBS. A continuación se llevó a cabo un lavado con 150 µl de PBS-TWEEN 0,1% (Sigma) y se incubaron las muestras con 50 µl de una dilución 1/300 del anticuerpo anti-C3b humano (MP Biomedicals) durante 30 min en oscuridad a 4°C. Las muestras fueron lavadas de nuevo, inactivadas con 100 µl de PFA al 3% en PBS y resuspendidas en 200 µl de PBS (Yuste *et al.*, 2008; Ramos-Sevillano *et al.*, 2012; Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Finalmente, se analizaron las muestras en el citómetro FACS Calibur (BD Biosciences) adquiriendo 25000 eventos y midiendo la intensidad de fluorescencia. En estos ensayos los resultados fueron representados como porcentaje del índice relativo de fluorescencia

(IRF) que se obtuvo multiplicando la proporción de bacteria positiva por la intensidad de fluorescencia, pero normalizando el valor obtenido al 100% del valor de la cepa silvestre o bien de la cepa no expuesta a ningún compuesto como aLf u hLf (Exley *et al.*, 2005; Ramos-Sevillano *et al.*, 2012). Además, se obtuvo un histograma a modo de ejemplo representativo a partir de una de las réplicas.

9.3. Interacción de neumococo con células de pulmón

Para investigar la implicación de DiiA en la adhesión a pulmón se realizaron estudios utilizando la línea celular de carcinoma pulmonar humano A549 (ATCC CCL185), derivada de neumocitos humanos tipo II. Las monocapas de células A549 se cultivaron en frascos de cultivo, utilizando medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor durante 1 h a 60°C, 5% glutamina y 5% de una combinación de antibióticos que contiene 100000 U/ml de penicilina y 100000 U/ml de estreptomicina hasta alcanzar 90-95% de confluencia. La noche antes de realizar el experimento, las células se cultivaron en placa de 24 pocillos (Falcon) con una densidad de 2.5×10^5 células por pocillo. El día del experimento, las células se infectaron con aislados bacterianos a razón de 25 bacterias por célula y se incubaron a 37°C durante 1 h en atmósfera con 5% de CO₂. Por último, los pocillos infectados se lavaron 2 veces con PBS, se trataron con 100 µl de saponina al 0.025% durante 10 min en agitación moderada y se rasparon con el émbolo de una jeringa. Se realizaron diluciones seriadas del contenido de los distintos pocillos para posteriormente añadirse a placas de agar sangre. Para calcular la proporción de bacterias recuperadas de las células infectadas, se llevó a cabo el correspondiente recuento de viables (UFC). Los resultados se expresaron como cantidad de bacteria adherida (UFC/ml).

Cuando se pretendió investigar la repercusión de aLf y hLf en la adhesión a células de pulmón, previa infección de las células A549, la bacteria se incubó a 37°C durante 1 h con aLf y hLf a 2 y 50 µg/ml en medio RPMI 1640.

10. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

10.1. Declaraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales que implicaron el uso de ratones se llevaron a cabo según la normativa dispuesta en la legislación española (RD 1201/2005) y en las normas de la Comunidad Europea (86/609/2005), además fueron aprobados por

el Comité de Uso y Cuidado de Animales del ISCIII (referencia de aprobación CBBA-PA 52_2011-v2 y PROEX 218/15). La realizadora dispone del certificado de categoría B que la acredita para llevar a cabo procedimientos de experimentación con animales (R.D. 1201/2005) (Código FCM/15/3LAB).

10.2. Características de los ratones empleados

Todos los ratones fueron suministrados por el Servicio de Veterinaria del ISCIII (Majadahonda). Los animales eran machos con entre 8 y 12 semanas de edad. En los estudios de patogénesis se utilizó la estirpe C57BL/6, mientras que para los ensayos de protección se empleó la estirpe BALB/c, excepto en aquellos casos en los que se llevara a cabo una inmunización IN, donde se usó la estirpe C57BL/6.

10.3. Modelo de colonización, neumonía bacteriémica y sepsis para estudios de patogenicidad

Los ensayos de infección se llevaron a cabo en ratones. Para cada tipo de infección se establecieron 4 grupos de ratones con al menos 6 individuos por grupo. Cada grupo de ratones fue co-infectado con la cepa silvestre TIGR4 y uno de los mutantes isogénicos en una proporción aproximada de 1:1, según lo descrito anteriormente (Yuste *et al.*, 2005). Para obtener las muestras, los animales fueron sacrificados mediante la inoculación IP de 200 µl de pentobarbital sódico 200 mg/ml (Dolethal®, Véthoquinol, España) diluido 1:6 en PBS. Los inóculos y las muestras obtenidas posteriormente fueron sembradas tanto en placas de agar sangre sin antibiótico como con cloranfenicol 2.5 µg/ml e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ durante al menos 24 h para llevar a cabo un recuento del número de UFC. El número de UFC de las cepas mutantes se determinó a partir de las placas con antibiótico, mientras que el de UFC de la cepa silvestre se estimó a partir de las placas sin antibiótico y substrayendo el número de UFC mutantes obtenidas. Esto es debido a que, al poseer el *cassette* de resistencia, los mutantes crecen en ambos tipos de placas, mientras que la cepa silvestre solo en aquellas sin antibiótico.

En los ensayos de colonización, los ratones fueron inoculados por vía IN con 10 µl de THY que contenían 1×10^7 UFC después de haber sido anestesiados en cámara de isoflurano (Forane®, Abbot, Madrid). Después de 5 días, los animales fueron

sacrificados y sometidos a un lavado nasofaríngeo con 500 µl de PBS desde la laringe hasta los orificios nasales.

En los ensayos de neumonía bacteriémica, los ratones fueron inoculados por vía IN con 50 µl que contenían 5×10^7 UFC previa anestesia con isoflurano. Después de 24 h de infección, se recuperó hasta 1 ml de sangre de la arteria femoral que se añadió a 50 µl de citrato sódico al 10% para prevenir la coagulación. Además, se llevó a cabo un lavado brocoalveolar (LBA) con 1 ml de PBS desde la laringe a todo el árbol bronquial mediante un catéter. Por último, se extrajeron los pulmones que se mantuvieron en 500 µl de PBS. El procesamiento de los pulmones se llevó a cabo añadiendo 2.5 ml de PBS y posterior homogenizado en filtros Cell Strainer (Corning).

En los ensayos de sepsis, los ratones fueron inoculados por vía IP con 200 µl de THY que contenían 5×10^3 UFC. Después de 24 h de infección, los animales fueron sacrificados y sometidos a la extracción de hasta 1 ml sangre mediante punción cardíaca a la que se añadió 50 µl de citrato sódico al 10%.

Para estimar el grado de virulencia de los distintos mutantes en los modelos animales, se determinó el índice de competitividad (IC) que es la relación entre la cantidad de bacteria recuperada del ratón y la cantidad de bacteria inoculada en el mismo, respecto a la cepa silvestre (Beuzon *et al.*, 2001; Yuste *et al.*, 2005; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). El IC se calculó de la siguiente manera:

$$IC = \frac{\text{UFC recuperadas del mutante/UFC recuperadas de TIGR4}}{\text{UFC inoculadas del mutante/UFC inoculadas de TIGR4}}$$

Posteriormente, los valores de este índice se expresaron como logaritmo (\log_{10}) para ser representados en las gráficas. Si el valor de IC es igual a uno (equivalente a un valor de cero en su logaritmo), no hay atenuación del mutante y, por lo tanto, este mutante es igual de virulento que la cepa silvestre. Valores inferiores a este punto de corte indican atenuación del mutante. Es importante destacar que cuanto menor es el valor del IC, mayor es el grado de atenuación del mutante en virulencia.

10.4. Determinación de la dosis letal mínima

Se inocularon grupos de 5 ratones BALB/c o C57BL/6 por vía IP o IN con diferentes diluciones bacterianas en medio THY para calcular la dosis letal mínima, definida como aquella que producía el 100% de mortalidad en un periodo de 7 días.

10.5. Pautas de inmunización

Los ensayos de inmunización se llevaron a cabo en modelos murinos. Se establecieron dos o tres grupos de ratones según el experimento. Al grupo control se le trató solo con el adyuvante hidróxido de aluminio (Alhydrogel 2%, InvivoGen) diluido al 2% en PBS. A los grupos de ratones inmunizados se le inocularon las proteínas DiiA-R1R2 y DiiA-NR en presencia del adyuvante en proporción 1:1 con el fin de aumentar la inmuogenicidad de los antígenos proteicos con los que se administró, de manera que la respuesta inmunitaria fuera más efectiva sin tener que incrementar la cantidad de proteína. Las cantidades de proteína utilizada fueron 10 o 20 µg/dosis/ratón según el experimento. Para los ensayos de inmunización a nivel sistémico se empleó la estirpe BALB/c, a los que se inoculó por vía IP, un volumen final de 200 µl/ratón/dosis. Para los ensayos de inmunización a nivel de mucosas se utilizó la estirpe de ratón C57BL/6. En este último caso, los animales fueron anestesiados en cámara de isoflurano (Forane®, Abbot) y posteriormente se les inoculó por vía IN, un volumen final de 20 µl/dosis/ratón. En ambos tipos de inmunización, se administraron los compuestos correspondientes los días 0, 7 y 14 (Corsini, 2016).

10.6. Obtención de muestras de ratones inmunizados

Los ratones inmunizados por vía IP de los que se obtuvo suero fueron sacrificados el día 21 tras la primera inmunización. Se extrajo la sangre por punción cardiaca que fue conservada a 4°C durante 30 min y posteriormente centrifugada a 2370 x g durante 5 min a 4°C. Los sueros de todos los animales del mismo grupo fueron mezclados y almacenados a -80°C hasta su utilización. A los ratones inmunizados por vía IN se les realizó un lavado nasofaríngeo con 250 µl de PBS. Los lavados procedentes de todos los ratones del mismo grupo fueron mezclados y almacenados a -80°C hasta su utilización.

10.7. Determinación de inmunoglobulinas

Las proteínas DiiA-R1R2, DiiA-R2, DiiA-NR fueron adsorbidas en placas de poliestireno de 96 pocillos Maxisorp (Nunc). Para ello se añadieron en cada pocillo 50 µl de las proteínas diluidas en PBS a una concentración de 10 o 20 µg/ml durante 2 h a 37°C. Para aquellas muestras que se obtuvieron tras una inmunización con 10 µg/ratón/dosis se utilizó la concentración en placa de 10 µg/ml, mientras que para las muestras obtenidas tras una inmunización con 20 µg/ratón/dosis se utilizó la

concentración de 20 µg/ml en placa. Una vez que las proteínas estaban fijadas a la placa, se añadieron 75 µl de PBS-BSA 2% (Sigma) como bloqueante a cada pocillo y se incubó durante 30 min a 37°C. Tras lavar con 100 µl de PBS-TWEEN 0.05% (Sigma) tres veces, se añadieron 50 µl de diluciones seriadas de los distintos sueros o LNF obtenidos de los ratones a los pocillos correspondientes. Las mezclas se incubaron durante 2 h a 37°C (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). A continuación, se realizó otra serie de lavados y se añadieron 50 µl de las distintas inmunoglobulinas anti-ratón (SouthernBiothec): IgG totales, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA diluidas 1/2000 en PBS en los pocillos correspondientes. Las mezclas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se añadieron 100 µl de ortofenildiamina (OPD) (Sigma) a cada pocillo como sustrato de la enzima peroxidasa hasta que se observó un color amarillento. En este momento se detuvo la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 3N (Merk) y se leyó la placa a 492 nm utilizando el espectrofotómetro Anthos 2020 (BioChrom).

10.8. Activación del C3b inducida por anticuerpos frente a DiiA

Para estudiar la capacidad de los anticuerpos producidos tras la inmunización con DiiA de activar el depósito de C3b sobre las bacterias, se incubaron 10 µl de PBS con 2.5×10^6 células de las distintas cepas de neumococo durante 1 h a 37°C en presencia de 10 µl de suero de ratones tratados solo con el adyuvante, o de suero de ratones inmunizado con DiiA-R1R2 o DiiA-NR. Los sueros fueron previamente diluidos 1/4 con PBS. Como control del experimento, se incubaron las cepas con 10 µL de PBS. Se llevó a cabo un lavado con PBS-TWEEN 0.1% (Sigma) y se incubaron las muestras con una dilución 1/300 del anticuerpo anti-C3b de ratón (Cappel) durante 30 min en oscuridad a 4°C. Las muestras fueron lavadas de nuevo, inactivadas con 100 µl de PFA al 3% en PBS y resuspendidas en 200 µl de PBS (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015; Ramos-Sevillano *et al.*, 2012). Finalmente, se analizaron las muestras mediante citometría de flujo como se ha descrito en el apartado 8.2.

10.9. Expresión de receptores CD-3, CD-4 y CD-8

Las muestras de bazo de ratones inmunizados por vía IP con DiiA-R1R2 se manipularon de la siguiente manera. Los ratones fueron sacrificados mediante la inoculación IP de 200 µl de pentobarbital sódico 200 mg/ml (Dolethal®, Véthoquinol, España) diluido 1:6 en PBS. Se extrajo el bazo que se conservó en 500 µL de medio

RPMI con L-Glutamina (Lonza) a 4°C hasta su procesamiento. El bazo se homogeneizó con un émbolo y se incorporó a un tubo Falcon de 50 ml al que posteriormente se le añadieron 10 ml de medio RPMI con L-Glutamina (Lonza). La mezcla se centrifugó 16550 x g durante 5 min a 4°C y el sedimento se resuspendió en 1 ml de una solución de lisis de eritrocitos (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 10 ml de solución de fijación [PBS al 2.5% de suero bovino fetal (Sigma)] y se centrifugó a 16550 x g durante 5 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en 5 ml de solución de fijación y se llevó a cabo un recuento del número de células.

Se incubaron 2×10^7 de las células de bazo de ratón en presencia de 50 µl de una dilución 1/300 de los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 de ratón en solución de fijación durante 30 min en oscuridad a 4°C. Tras lavar las muestras con la solución de fijación, se inactivaron con 50 µl de PFA 3% en PBS y se resuspendieron en 150 µl de solución de fijación. Finalmente, se analizaron las muestras en el citómetro FACS Calibur (BD Biosciences) adquiriendo 15000 eventos y midiendo la intensidad de fluorescencia. En estos ensayos los resultados fueron representados como porcentaje de células T detectadas.

10.10. Modelos de infección en ratones inmunizados

En los ensayos de sepsis, los ratones inmunizados fueron infectados por vía IP el día 21, tras la primera dosis de inmunización, con 1.25×10^5 y 1×10^8 UFC de las cepas TIGR4 y 48, respectivamente, en un volumen de 200 µl de caldo THY.

En los ensayos de neumonía bacteriémica, los ratones inmunizados fueron infectados por vía IN el día 21, tras la primera dosis de inmunización, con 8.4×10^8 UFC de la cepa TIGR4 en un volumen de 50 µl de caldo THY.

En los ensayos de sepsis y neumonía bacteriémica, la tasa de supervivencia de los animales fue anotada durante 7 días. A partir de estos datos se generaron las curvas de supervivencia. Además, se tomaron 6 µl de sangre de la cola de los ratones cada 24 h hasta su muerte (Cafini *et al.*, 2010) a partir de los cuales se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en placas de agar sangre para llevar a cabo un recuento de bacterias viables. En este caso los resultados se expresaron como \log_{10} (UFC/ml).

En los ensayos de colonización, los ratones inmunizados fueron infectados por vía IN el día 21, tras la primera dosis de inmunización, con 2.8×10^6 UFC de la cepa TIGR4 en un volumen de 10 µl de caldo THY en animales previamente anestesiados con

isoflurano. A los 5 días tras la colonización, los animales fueron sacrificados mediante la inoculación IP de 200 μ l de pentobarbital sódico 200 mg/ml (Dolethal®, Véthoquinol, España) diluido 1:6 en PBS y se llevó a cabo un lavado nasofaríngeo con 500 μ l de PBS. Diluciones de estas muestras se sembraron en placas de agar sangre para llevar a cabo un recuento de bacterias viables en las mismas. Los resultados se expresaron como \log_{10} (UFC/ml).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos que se muestran a lo largo de esta Tesis Doctoral son representativos de los resultados obtenidos de la repetición de un mínimo de tres experimentos, en cada uno de ellos se llevó a cabo entre 3 y 4 réplicas. Para comparar variables cualitativas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado y para las variables cuantitativas la prueba *t* de Student. En los experimentos de supervivencia se empleó la prueba log-rank ordinal (Mantel Cox). Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA, GENÓMICA Y PROTEÍCA DE DiiA

Las herramientas computacionales han favorecido la caracterización de numerosas proteínas implicadas, muchas de ellas, en aspectos biológicos esenciales. Las proteínas de función desconocida pueden encontrarse en la superficie bacteriana y presentar una topología basada en repeticiones. Estas proteínas de pared pueden presentar cierto grado de homología con otras proteínas pertenecientes a especies del mismo género. Sin embargo, las diferencias en su composición y estructura hacen que adquieran una función determinada que contribuya a la especialización del clon. Concretamente, la proteína SP1992 de la cepa TIGR4 ha sido descrita como antigénica (Giefing *et al.*, 2008), lo que indica que no solo se encuentra en la superficie bacteriana, sino también que se expresa dentro del humano y que este a su vez es capaz de producir una RI frente a dicha proteína. En función de estos datos se planteó caracterizar la proteína codificada por el locus *sp1992* de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*. A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, que se detallan en los próximos apartados, la proteína SP1992 se renombró como DiiA (*Dimorphic invasion-involved protein A*, en castellano, proteína dimórfica A implicada en invasión).

1.1. Estudio del gen *diiA*

La búsqueda de la secuencia de SP1992 por BLAST en la base de datos UNIPROT reveló que todas las secuencias homólogas a ésta, en longitud completa y con identidad superior al 50%, pertenecían a la especie *S. pneumoniae*. La mayoría de estas secuencias presentaban una longitud de 221 o 297 aa, lo que sugería la existencia de dos variantes alélicas. Los algoritmos presentes en UNIPROT no pudieron asociar una función para la proteína codificada por el locus *sp1992*, por lo que se asumió que esta se incluía dentro del grupo de proteínas de función desconocida.

Debido a la complejidad que supone predecir el codón de inicio en una proteína, sobre todo con longitud alélica variable (Bocs *et al.*, 2002), se analizó manualmente la región anterior a la codificante de *sp1992* en el genoma de TIGR4. En esta zona se encontraron numerosos codones de parada en todos los marcos de lectura, excepto en los 100 nt localizados en el marco de lectura y dirección codificante, lo que sugiere que el gen en realidad es más largo que la versión anotada. Se ajustó el codón de inicio adicionando 99 nuevos nt a la región codificante, siendo el codón de inicio alternativo GTT. Este codón varía en uno o dos nucleótidos con respecto a los codones más

comunes, GTG y ATG, respectivamente, y puede operar funcionalmente como codón de inicio transcripcional aunque con menor eficacia (Mir *et al.*, 2012). El gen resultante aceptado consistía en 993 nt y codificaba una proteína de 330 aa considerada aquí como definitiva (Figura 5A). Una búsqueda de la secuencia de este nuevo gen en 18 genomas completos de neumococo mediante MegaBLAST corroboró la existencia de dos alelos de diferente longitud. El alelo corto presentaba una delección de 249 nt, correspondiente a 83 residuos en la secuencia de aminoácidos, y codificaba una proteína de 247 residuos. Este es el caso de la cepa de referencia D39 (Figura 5A).

Considerando que la proteína codificada por este gen no tiene función asignada, se analizaron los genes próximos, con el objetivo de inferir su función por contexto genómico. Sin embargo, el gen no pertenecía aparentemente a ningún operón según el protocolo de Price. En esta línea, se localizaron terminadores de transcripción tanto 227 nt antes como 138 nt después de la región codificante aceptada, por lo que este gen parecía ser parte de un transcrito monocistrónico. Además, la base de datos STRING, que unifica datos experimentales y predicciones de al menos 7 fuentes, mostraba que la proteína no interactuaba con otras. Estos resultados sugieren que el gen no se co-transcribe con otros genes y que la proteína SP1992 no juega un papel relevante en la fisiología celular basal, como se ha descrito para otros factores de virulencia (Hava y Camilli, 2002).

1.2. Topología de dominios de la proteína DiiA

La arquitectura de la proteína se estudió mediante diversos análisis (Figura 5). El obtenido de Pfam determinó que en el extremo C-terminal existía un módulo de anclaje a membrana muy conservado en bacterias Gram-positivas con el motivo LPxTG y un dominio de función desconocida denominado DUF1542 (DUF: *domain of unknown function*). La mayoría de los aminoácidos de DiiA parecen estar expuestos al exterior según el programa Phobius, lo que se corresponde con el hecho de que esta proteína sea reconocida por anticuerpos presentes en el suero de pacientes (Giefing *et al.*, 2008). La sección de la proteína expuesta al exterior está predicha como desestructurada excepto dos zonas en la región N-terminal para las que se predijo un plegamiento en lámina- β . Se observó que dos secciones de 37 residuos, correspondientes a las regiones plegadas, compartían un 51% de identidad y un 67% de similitud por lo que fueron nombradas como Repetición 1 (R1) y Repetición 2 (R2). Estos datos junto con el hecho de que el motivo repetido es reconocido por Pfam como un dominio proteico son evidencias que

respaldan que los residuos añadidos manualmente son realmente parte de esta proteína. La versión corta de DiiA, codificada por ejemplo por el locus *spd1789* de la cepa D39, carece de R1. Sin embargo, ambos tipos de variantes mantienen la repetición R2. Lo que también se conserva en ambas versiones alélicas por igual es la sección central de DiiA que según Dis-EMBL, COILS y Paircoil2 contiene dos regiones *coiled-coil* seguidas (entre los residuos 176-207 y los residuos 218-248), probablemente involucradas en oligomerización, y según SEG una secuencia de baja complejidad comprendida entre los residuos 142 y 175.

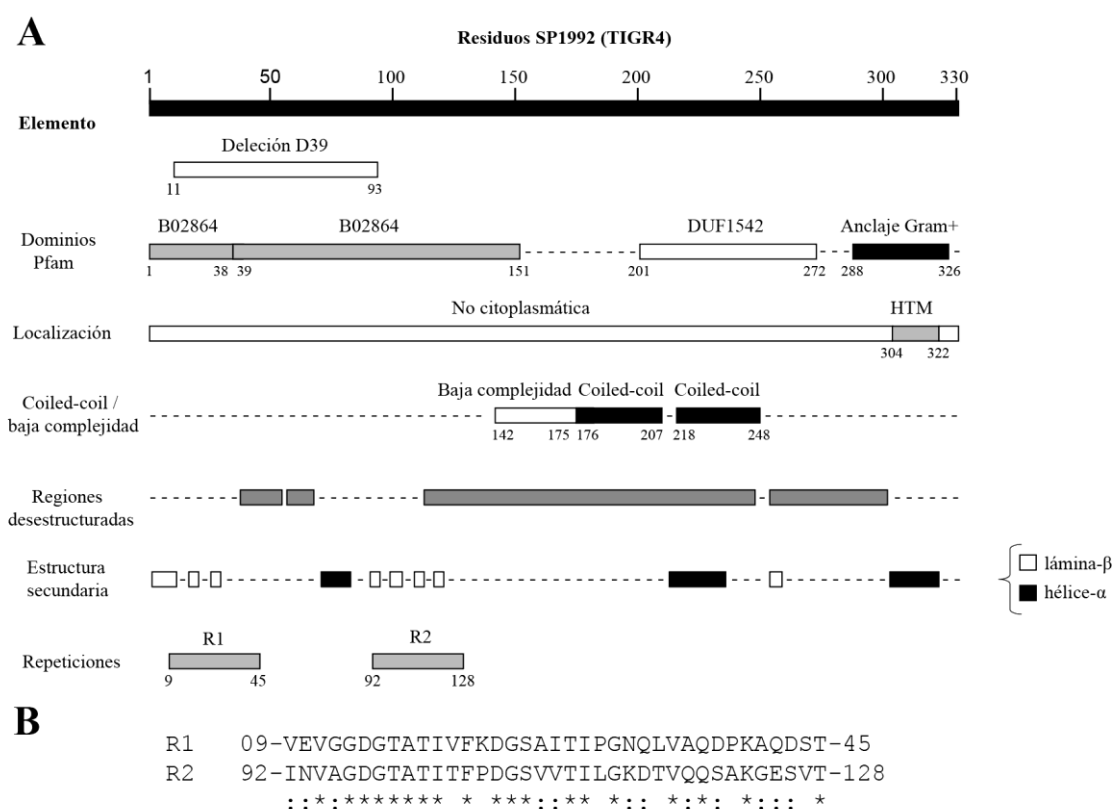


Figura 5. Arquitectura de la proteína SP1992. A: Motivos y predicciones encontradas en la secuencia. TMH: hélices transmembrana; R: repetición. B: Alineamiento de las repeticiones R1 y R2. Se muestran los residuos idénticos (*) y similares (:).

DiiA presenta por tanto una topología típicamente asociada a adhesinas (Lin *et al.*, 2012) con un anclaje a pared celular, un tallo central desestructurado y la existencia de dominios plegados en el extremo más distal, que además difieren en el número de repeticiones de un modo dependiente de alelo (Figura 6).

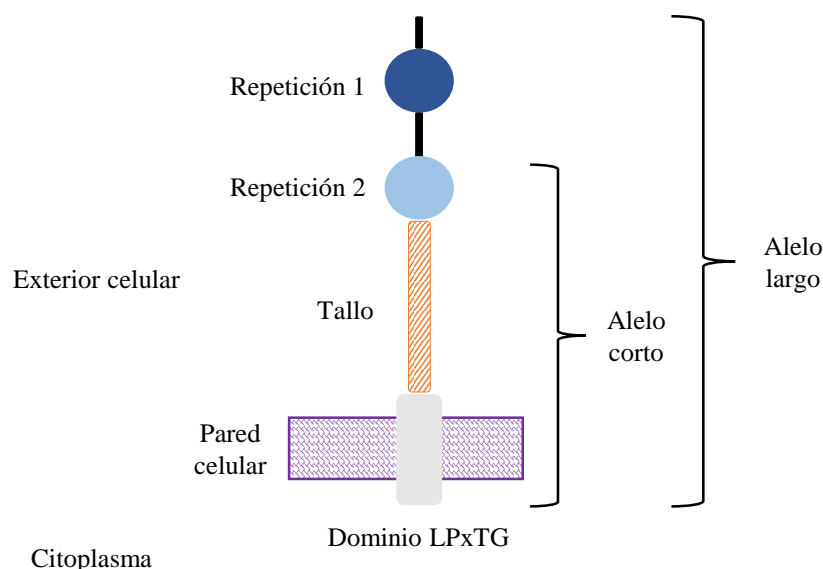


Figura 6. Representación esquemática de la arquitectura de la proteína codificada por el alelo largo de *diiA* con sus dominios anotados.

Dada la presencia de regiones *coiled-coil* y la posible naturaleza adhesiva de las repeticiones, se analizó la capacidad de la proteína para oligomerizar *in vitro*. Esta propiedad aumentaría localmente los grupos de unión a un posible receptor en el hospedador. Para ello se purificaron versiones recombinantes de la proteína expresadas en *E. coli* incluyendo las dos (DiiA-R1R2), una (DiiA-R2) o ninguna (DiiA-NR) repetición (Figura 7). En todos los casos se evitó la inclusión tanto de los siete residuos distales de la región N-terminal como del dominio de anclaje a pared en el extremo C-terminal. Esta estrategia aumentó la solubilidad de dichas proteínas.

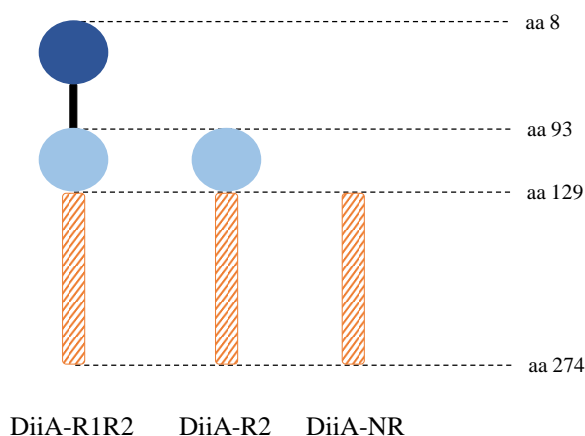


Figura 7. Esquemas de los fragmentos recombinantes DiiA-R1R2, DiiA-R2 y DiiA-NR con sus respectivos dominios y los aminoácidos limitantes de los mismos.

La proteína completa (con dos repeticiones) migraba electroforéticamente una distancia similar a la predicha (~39 kDa) una vez hervida y en presencia de SDS (Figura

8A). Sin embargo, en condiciones no desnaturalizantes, la entidad mostró una masa molecular de unos 310 kDa, correspondiente aproximadamente a un octámero (Figura 8A). Este hecho se confirmó mediante cromatografía de filtración en gel (Figura 8B).

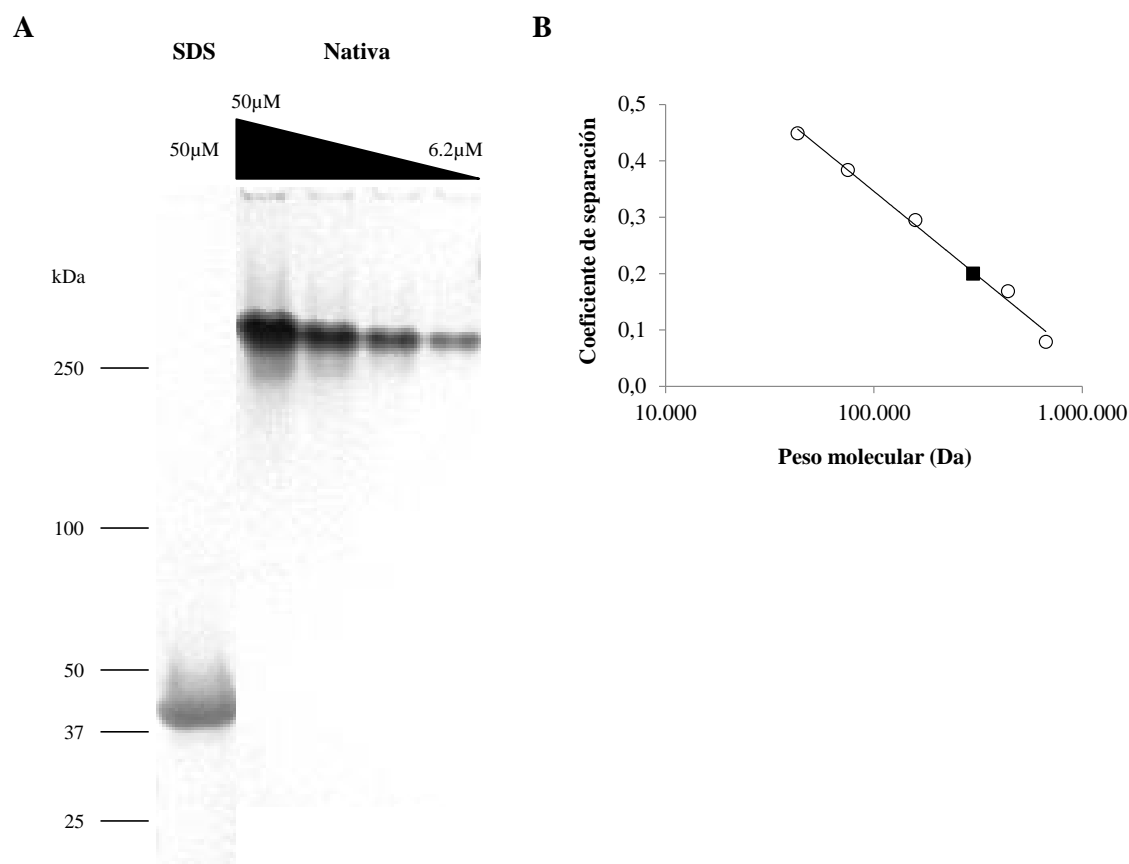


Figura 8. Determinación de la masa molecular de DiiA. A: Electroforesis con SDS y nativa de la proteína purificada. 7.5 ml de solución proteica a diferentes concentraciones, se cargó en geles que contenían entre un 4 y un 15% de poliacrilamida TGX (Bio-Rad). B: Determinación del tamaño molecular por cromatografía de filtración en gel. Las muestras que contenían 1 mg de proteína se cargaron en una columna Superdex 200 10/300 GL y se eluyeron con NaCl 100 nM, EDTA 1 nM y Tris-HCl 20 nM a pH 7.5. La proteína DiiA (cuadrado negro) y las proteínas del kit HMW (GE Healthcare) para la calibración de la filtración en gel (círculos blancos) se muestran en la figura.

1.3. Expresión de DiiA en la superficie bacteriana

Aunque la proteína DiiA ya se había detectado *in vivo* (Giefing *et al.*, 2008), se consideró importante determinar también si esta proteína era capaz de expresarse en condiciones de laboratorio. Para ello se incubó la cepa TIGR4 y su mutante TIGR4 Δ diiA con anticuerpos producidos en ratón frente a la versión larga de DiiA. Mediante citometría de flujo se detectó la presencia de DiiA sobre la superficie bacteriana de la cepa silvestre en mayor proporción que en el mutante carente de DiiA ($P = 0.028$; prueba *t* de Student) (Figura 9).

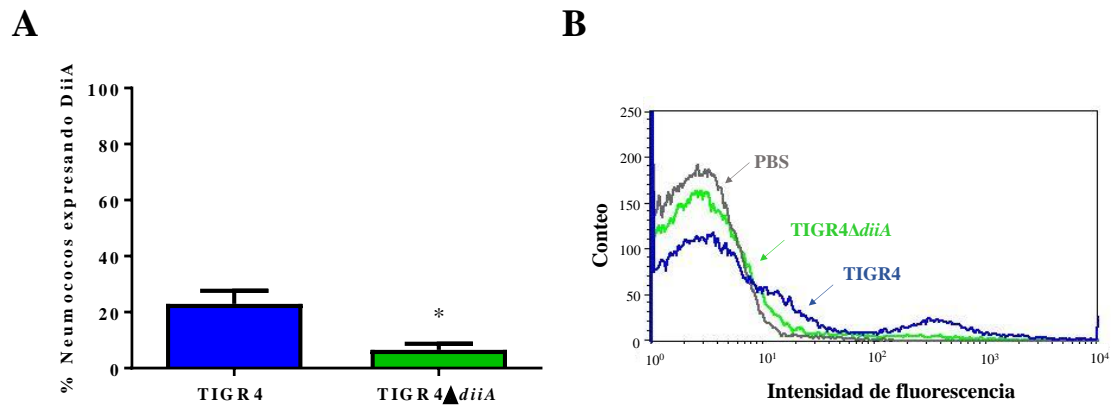
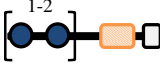

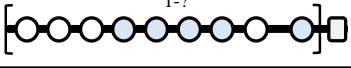
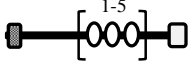
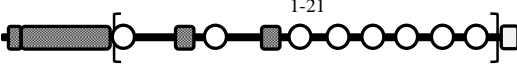


Figura 9. Determinación de la expresión de DiiA sobre la superficie bacteriana *in vitro*. Las barras de error representan la desviación estándar. *: $P < 0.05$.

1.4. Comparación de los dominios de DiiA con proteínas similares de otros estreptococos

La combinación de dominios de DiiA: R1-R2-DUF1542-LPxTG, se encontró únicamente en *S. pneumoniae*. De hecho, cuando se comparó la arquitectura de dominios de DiiA con proteínas semejantes en las dos especies de estreptococos más próximos genéticamente: *S. pseudopneumoniae* y *S. mitis* y con proteínas presentes en otros estreptococos patógenos, como *S. pyogenes* y *S. agalactiae*, se observaron diferencias tanto en el número de repeticiones, como en el grado de identidad de las mismas (Figura 10). Todas ellas compartían el módulo de anclaje a pared, pero carecían del dominio DUF1542. En el caso de las especies genéticamente relacionadas, el número de repeticiones se mantenía en algunos casos, pero dichas repeticiones compartían menos de un 50% de identidad con las de DiiA. Las proteínas M y Rib de *S. pyogenes* y *S. agalactiae*, respectivamente, presentaban un número muy variable de repeticiones, que compartían menos de un 30% de identidad con respecto a las de DiiA. Por todo ello, no se podía establecer ninguna relación ortóloga, surgidas verticalmente por especiación, entre DiiA y estas variantes proteicas de otros estreptococos sino que se habrían formado *de novo* a partir de eventos genéticos diferentes.

Cepa	Entrada (longitud)	Nombre de la familia	Topología de dominios/motivos	Motivo repetido
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	Q97NM8 (330 aa)	Ninguno		B02864
<i>S. pseudopneumoniae</i> IS7493	G0I6Y3 (185 aa)	Ninguno		B13329
<i>S. mitis</i> SK569	F9MHJ3 (738 aa)	Ninguno		B13329
<i>S. pyogenes</i> M49	P16947 (389 aa)	Proteína M		Repetición proteína M
<i>S. agalactiae</i> NEM316	Q8E6U1 (1126 aa)	Rib / alpha / R28		Rib

Repeticiones:

- Identidad >50%
- Identidad 40-50%
- Identidad 30-40%
- Identidad <30%

Dominios:

- DUF1542
- Anclaje Gram+
- Otros dominios

Figura 10. Arquitectura de dominios de proteínas similares a DiiA en otras especies de estreptococos. Se representa la arquitectura determinada por Pfam de los homólogos representativos seleccionados. Los números entre corchetes indican el rango de repeticiones encontradas por Pfam. El código de colores de las repeticiones se basa en el grado de identidad con respecto a las repeticiones R1 y R2 de DiiA.

1.5. Especificidad de DiiA

Para investigar el posible origen evolutivo de DiiA, se estudió su entorno genómico (Figura 11A) y se comparó con el de las dos especies más similares a neumococo mencionadas anteriormente. Los genes que flanquean a DiiA en *S. pneumoniae*, *tatD* y *rpmH*, se encontraban también próximos en *S. pseudopneumoniae* y *S. mitis*, concretamente localizados entre 0.25 y 0.29 Mb del origen de replicación aunque flanqueando otros genes (Figura 11B, C). Además, los genes que codifican las proteínas similares a DiiA en estas especies se localizaban distantes en el cromosoma, a 0.58 y 0.84 Mb del origen, respectivamente. Además, estos genes se encontraban próximos a secuencias de inserción y transposasas (Figura 11B, C), indicativo de que constituirían regiones genéticamente inestables.

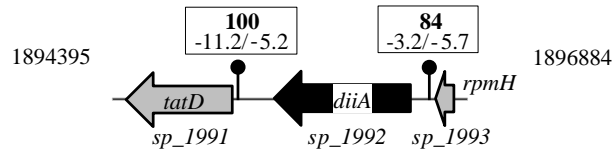
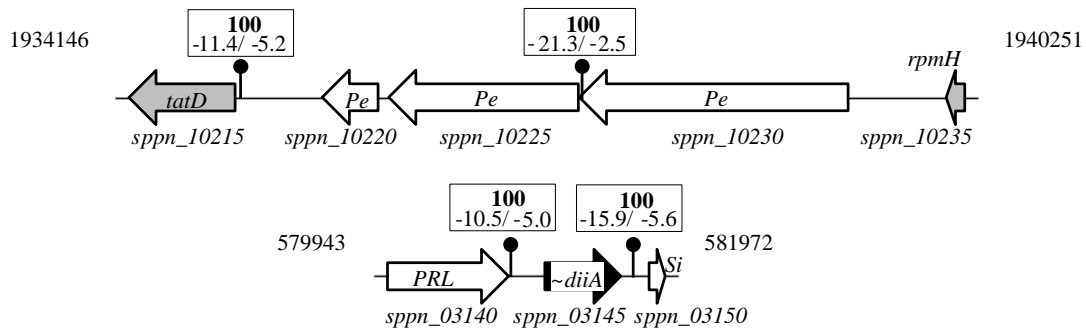
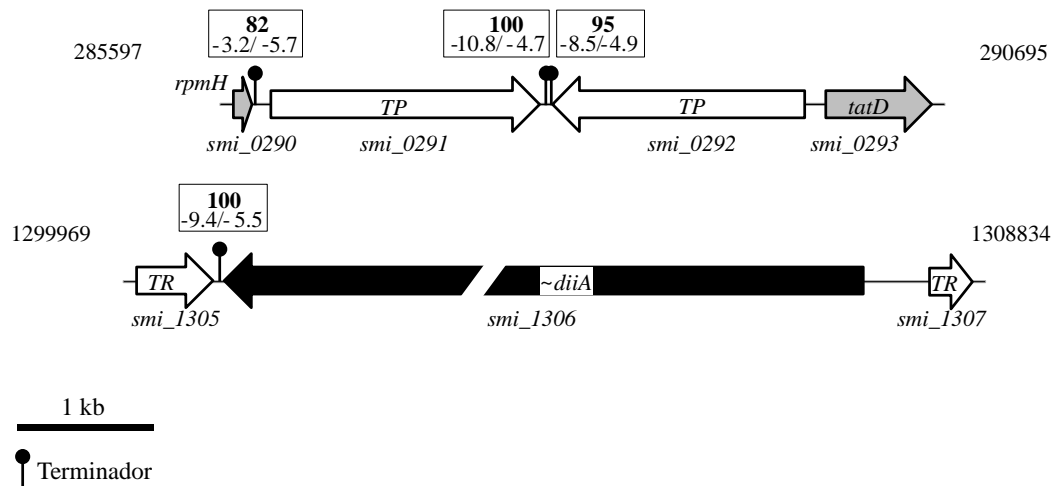
A***S. pneumoniae* TIGR4****B*****S. pseudopneumoniae* IS7493****C*****S. mitis* B6**

Figura 11. Organización del genoma de las proteínas similares a DiiA y de genes flanqueantes en estreptococos, donde *S. pneumoniae* se muestra como la referencia (A). Se muestran regiones equivalentes a proteínas similares a DiiA y genes flanqueantes (*tatD* y *rpmH*) detectados en *S. pseudopneumoniae* (B) y *S. mitis* (C). El rango de confianza de la horquilla y de la cola de los terminadores predichos están indicados sobre el símbolo de terminador. La posición de los nucleótidos en el genoma se muestra indicando el primer gen inmediatamente antes y después en cada adaptación. Los códigos de los marcos de lectura abiertos se indican debajo de cada gen. Si: secuencia de inserción; PRL: proteína rica en leucina; rpmH: proteína ribosomal L34; Pe: proteína externa; tatD: desoxirribonucleasa Tata; TP: transportador; TR: transposasa.

2. RELEVANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LOS ALELOS DE *diiA*

La clasificación bimodal de la EN según la presencia de invasión durante la infección y la existencia de dos alelos para el gen *diiA* sugerían que la presencia de una determinada versión de DiiA podría condicionar el desarrollo de la patología por *S. pneumoniae*.

2.1. Distribución de las variantes alélicas en cepas clínicas

Se determinó el alelo de *diiA* en 560 cepas clínicas mediante PCR (Figura 12), detectándose alguna de las dos versiones en todas las cepas clínicas estudiadas. Esto confirmaba que *diiA* es parte del genoma núcleo de neumococo (Hiller *et al.*, 2007) y que el exclusivo dimorfismo alélico observado en los genomas secuenciados era el patrón existente en la naturaleza.

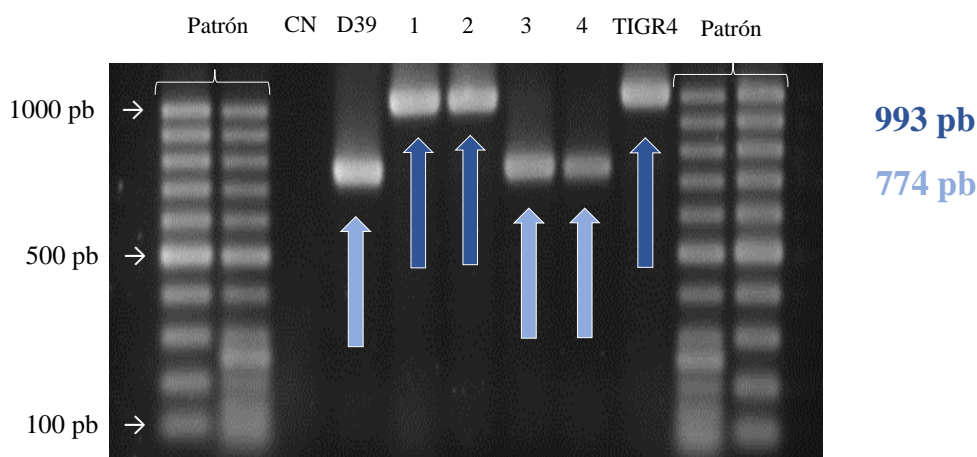


Figura 12. Gel de agarosa en el que se muestran los productos de PCR tras amplificación del gen *diiA*. Como referencia aparecen las cepas D39 y TIGR4. Los dígitos del 1 al 4 hacen referencia a distintas cepas de *S. pneumoniae*. CN, control negativo; pb, pares de bases.

El estudio de la distribución alélica se centró en los 22 serotipos y 18 complejos clonales mayoritarios de las cepas clínicas de neumococo analizadas. Se observó que pese a existir una cierta correlación a nivel de serotipos, solo el 77.8% del total de los aislados dentro del mismo serotipo presentaban el mismo tipo de alelo de *diiA* (Figura 13), siendo los serotipos 3, 19A y 19F los que presentaban mayor heterogeneidad.

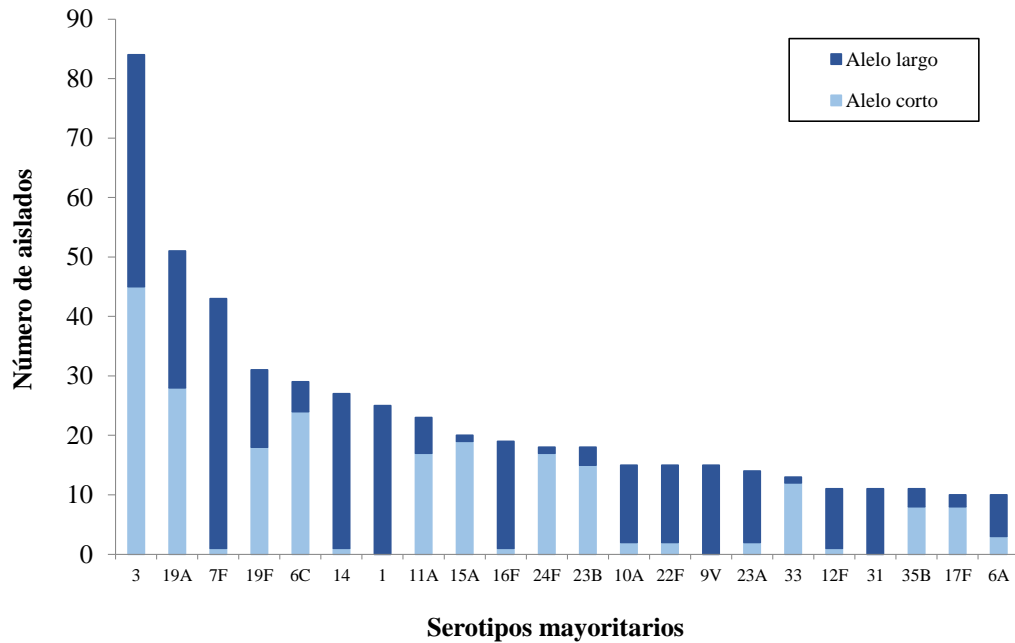


Figura 13. Distribución del tipo de alelo de DiiA en los serotipos mayoritarios.

Sin embargo, la correlación entre el tipo de alelo de *diiA* y el complejo clonal fue del 93.3% (Figura 14), un valor similar al publicado para otros factores de virulencia como PrtA y PspA (Rolo *et al.*, 2009; Muñoz-Almagro *et al.*, 2010). La concordancia entre el alelo de *diiA* y el complejo clonal aumentó hasta el 96.8%, cuando los complejos clonales 180 y 260 que expresan el serotipo 3 fueron excluidos. Estos resultados indicaban que el dimorfismo de DiiA es una propiedad clonal esencial en neumococo.

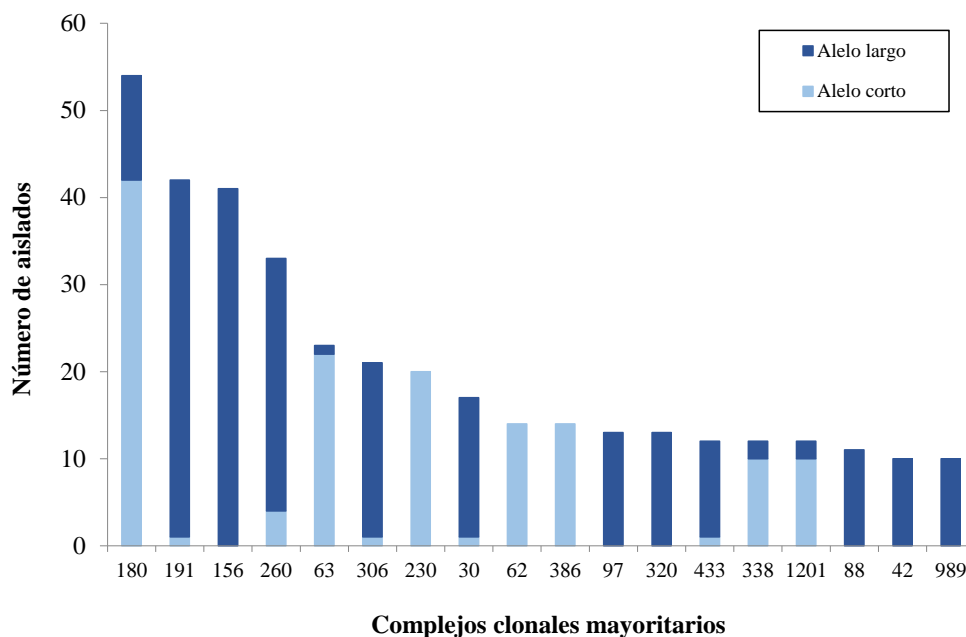


Figura 14. Distribución del tipo de alelo de DiiA en los complejos clonales mayoritarios.

2.2. Asociación entre variante alélica y enfermedad neumocócica

De las 560 cepas estudiadas, 273 se correspondían con ENI y 287 con ENNI. Cuando se estudió la relación entre variante alélica y enfermedad neumocócica en la muestra de aislados clínicos (Figura 15), no se observó ninguna asociación significativa entre alelo y ENNI ($P = 0.85$, análisis Chi-cuadrado). Sin embargo, sí se encontró una correlación significativa entre los aislados que presentaban el alelo largo y la producción de ENI ($P = 3 \times 10^{-6}$, análisis Chi-cuadrado). Esta tendencia fue más acentuada en los 18 complejos clonales altamente infecciosos ($P = 3 \times 10^{-10}$; análisis Chi-cuadrado), mientras que en la ENNI, la proporción alélica permaneció similar ($P = 0.62$; análisis Chi-cuadrado). Cuando se estudió la correlación entre el tipo de alelo y las características de los pacientes, se encontró que mientras que el 75.4% de los aislados que presentaban el alelo corto infectaban pacientes con factores de riesgo (EPOC y/o ≥ 70 años), este parámetro disminuía al 57.7% para aislados que presentaban el alelo largo ($P = 1 \times 10^{-10}$; análisis Chi-cuadrado).

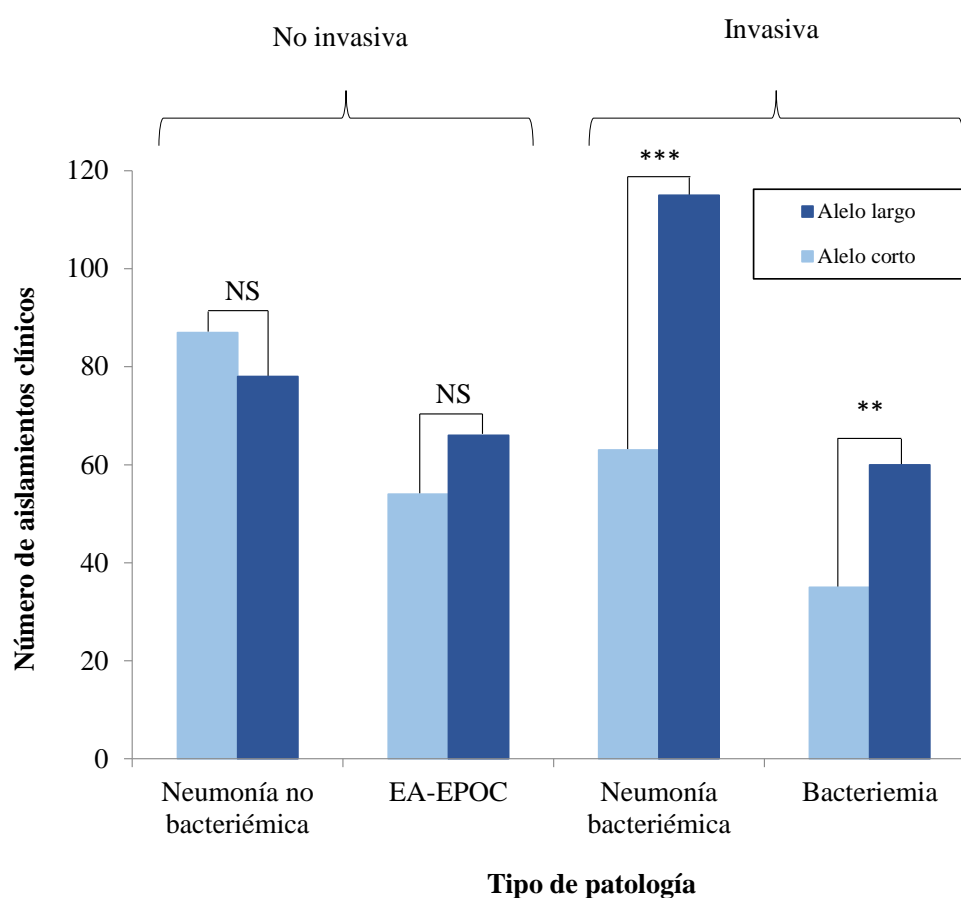


Figura 15. Número de aislados clínicos considerados según el tipo de patología. EA-EPOC: exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica; NS (no significativo): $P > 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

De hecho, el alelo largo es el preferente en aquellos complejos clonales para los que existen numerosos registros en la literatura que indican que poseen una elevada capacidad de producir infecciones invasivas (Figura 16). La correlación entre tipo de alelo e invasividad respalda la denominación de los homólogos SP1992 como DiiA (*Dimorphic invasion-involved protein A*).

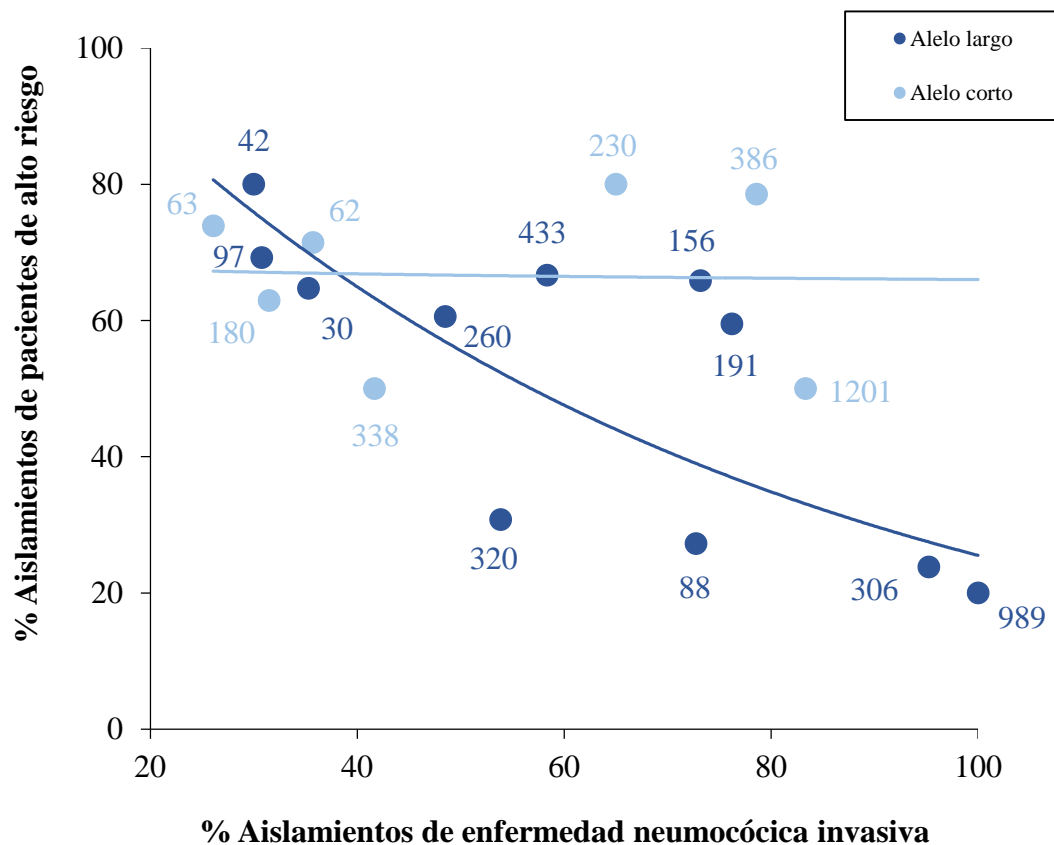


Figura 16. Frecuencia de los aislados de *S. pneumoniae* de los complejos clonales mayoritarios procedentes de pacientes con factores de riesgo y de enfermedad neumocócica invasiva. Se muestra en azul claro la línea de tendencia del alelo corto y en azul oscuro la del alelo largo.

3. IMPLICACIÓN DE DiiA EN LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

Teniendo en cuenta que DiiA es una proteína exclusiva de *S. pneumoniae* y que esta bacteria es uno de los principales patógenos en humanos, se estudió la relevancia de DiiA en la infección neumocócica.

3.1. Contribución de DiiA a la patogénesis por *S. pneumoniae*

Para conocer el papel que tiene la proteína DiiA durante la infección neumocócica se realizaron experimentos de colonización, neumonía y sepsis en modelos animales. Con el fin de ponderar la importancia de cada región de esta proteína en estos procesos, se construyeron mutantes de delección progresivos en la cepa TIGR4. Estos mutantes presentaron una tasa de crecimiento no inferior al 5% respecto de la cepa silvestre

(datos no mostrados). Las cepas construidas fueron: (1) TIGR4-R1R2, donde el gen se encontraba completo (incluyendo las dos repeticiones), pero que a diferencia de la cepa silvestre TIGR4 contenía el *cassette* de resistencia a cloranfenicol; (2) TIGR4-R2, que poseía la delección de la repetición R1, mimetizando así el alelo corto silvestre; (3) TIGR4-NR, el mutante sin ninguna repetición, pero que mantenía el resto de la proteína; y (4) TIGR4 Δ *diiA*, con una delección completa del gen *diiA* (Figura 17). Todos los mutantes presentaban el *cassette* de resistencia a cloranfenicol como marcador de selección. En aquellos mutantes que presentaban el gen *diiA* de manera total o parcial, dicho gen se encontraba invertido para evitar recombinaciones parciales durante la construcción de los mutantes. Este último hecho no interfiere en la transcripción de genes adyacentes, ya que éste no pertenece a ningún operón.

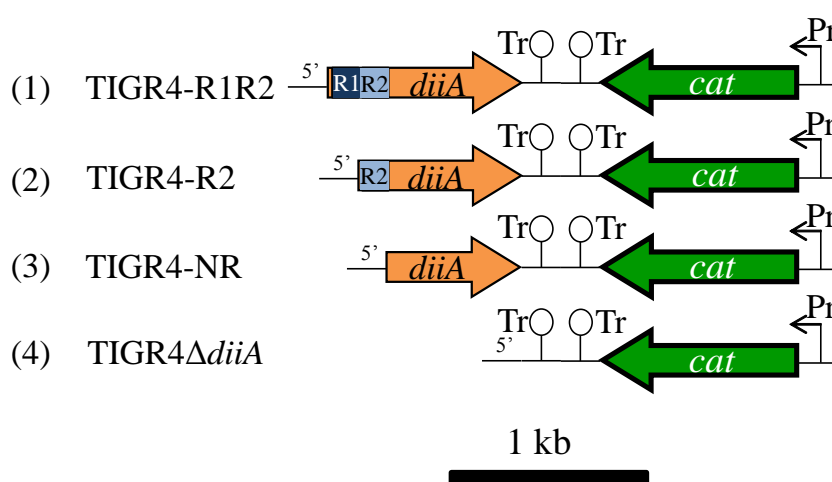


Figura 17. Representación esquemática de los mutantes construidos. Pr: promotor y Tr: terminador de la transcripción.

El grado de atenuación en virulencia de los mutantes se calculó utilizando el IC como se ha descrito previamente en la sección de Materiales y Métodos. En todas las situaciones analizadas, el mutante TIGR4-R1R2 fue casi tan virulento como la cepa de referencia ($IC > 0.1$) (Figuras 18-21), lo que confirmaba que ni la manipulación genética, ni la introducción del *cassette* de resistencia a cloranfenicol afectaban destacablemente a la virulencia de los mutantes construidos.

3.1.1. Papel de DiiA en la colonización de la nasofaringe

En el lavado nasofaríngeo de ratones previamente colonizados, la cantidad de bacterias recuperadas de los mutantes TIGR4-NR y TIGR4 Δ *diiA* fue significativamente inferior respecto del mutante TIGR4-R1R2 ($P = 4 \times 10^{-5}$ y $P = 1 \times 10^{-8}$, respectivamente; prueba *t* de Student) (Figura 18). El hecho de que ambos mutantes

carezcan de las repeticiones R1 y R2, indica que las repeticiones están implicadas en el proceso de colonización de neumococo a nivel del tracto respiratorio superior.

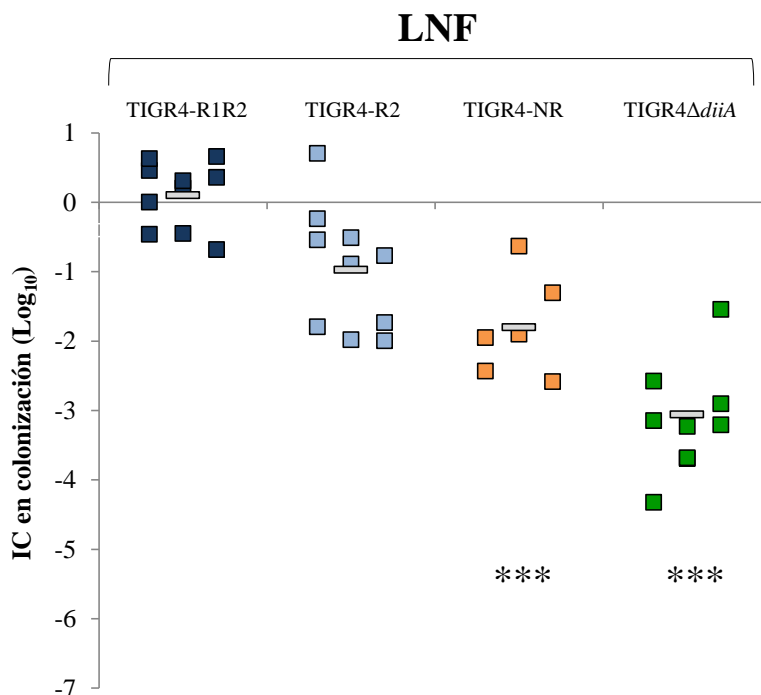


Figura 18. Determinación de la virulencia de los mutantes en DiiA utilizando un modelo murino de colonización. Se representan los valores de los índices de competitividad (IC) de los mutantes en muestra de lavado nasofaríngeo (LNF). Cada cuadrado representa un ratón, mientras que las barras horizontales representan la media. ***: $P < 0.001$.

3.1.2. Papel de DiiA en el proceso de neumonía invasiva

Para mimetizar las condiciones de ENI y con el fin de reproducir la vía natural de la infección neumocócica, los animales fueron inoculados por vía IN con las diferentes cepas y se tomaron y analizaron muestras de distintos tejidos. El número de UFC obtenidas a partir de las muestras de LBA mostró que los mutantes que no presentaban ninguna de las repeticiones estaban más atenuados respecto a la cepa control TIGR4-R1R2 ($IC < 0.1$) (Figura 19), lo cual demuestra una menor capacidad de persistencia, ya a corto plazo, en el tracto respiratorio inferior. Los mutantes TIGR4-NR y TIGR4ΔdiiA mostraron, por tanto, una reducción significativa de la capacidad de replicación de la bacteria en el tracto respiratorio superior e inferior.

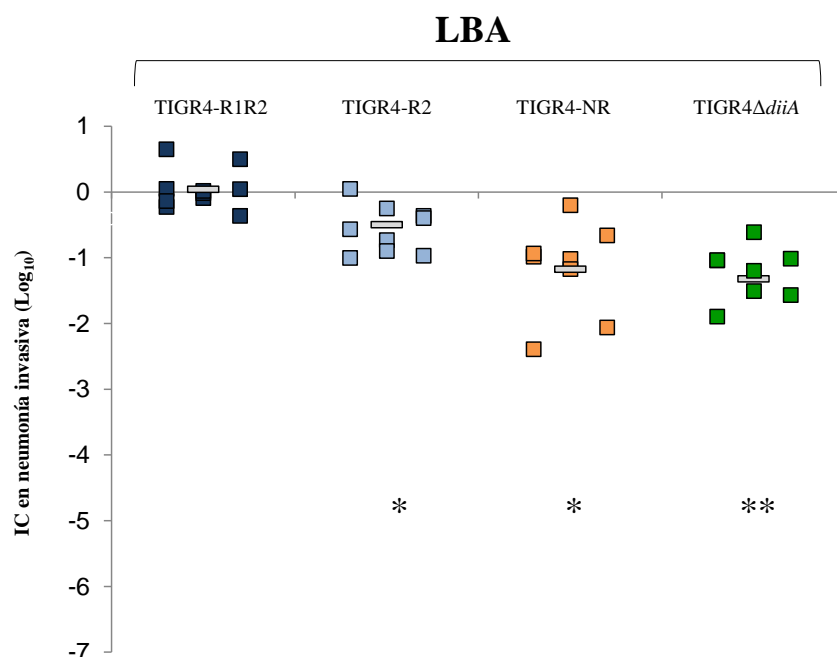


Figura 19. Determinación de la virulencia de los mutantes en DiiA utilizando un modelo murino de neumonía invasiva. Se representan los valores de los índices de competitividad (IC) de los mutantes en muestra de lavado broncoalveolar (LBA). Cada cuadrado representa un ratón, mientras que las barras horizontales representan la media. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Por otro lado, se observó una atenuación relevante en muestras de pulmón y sangre para el mutante TIGR4-R2 (IC: 10^{-1} - 10^{-3}) (Figura 20), lo que sugiere que la repetición R1 juega un papel importante en la internalización a nivel de pulmón y en la diseminación de la bacteria a sangre. Además, en estas muestras, los mutantes TIGR4-NR y TIGR4ΔdiiA (IC: 10^{-3} - 10^{-4} en ambos casos) mostraron una atenuación en virulencia aún más marcada (Figura 20).

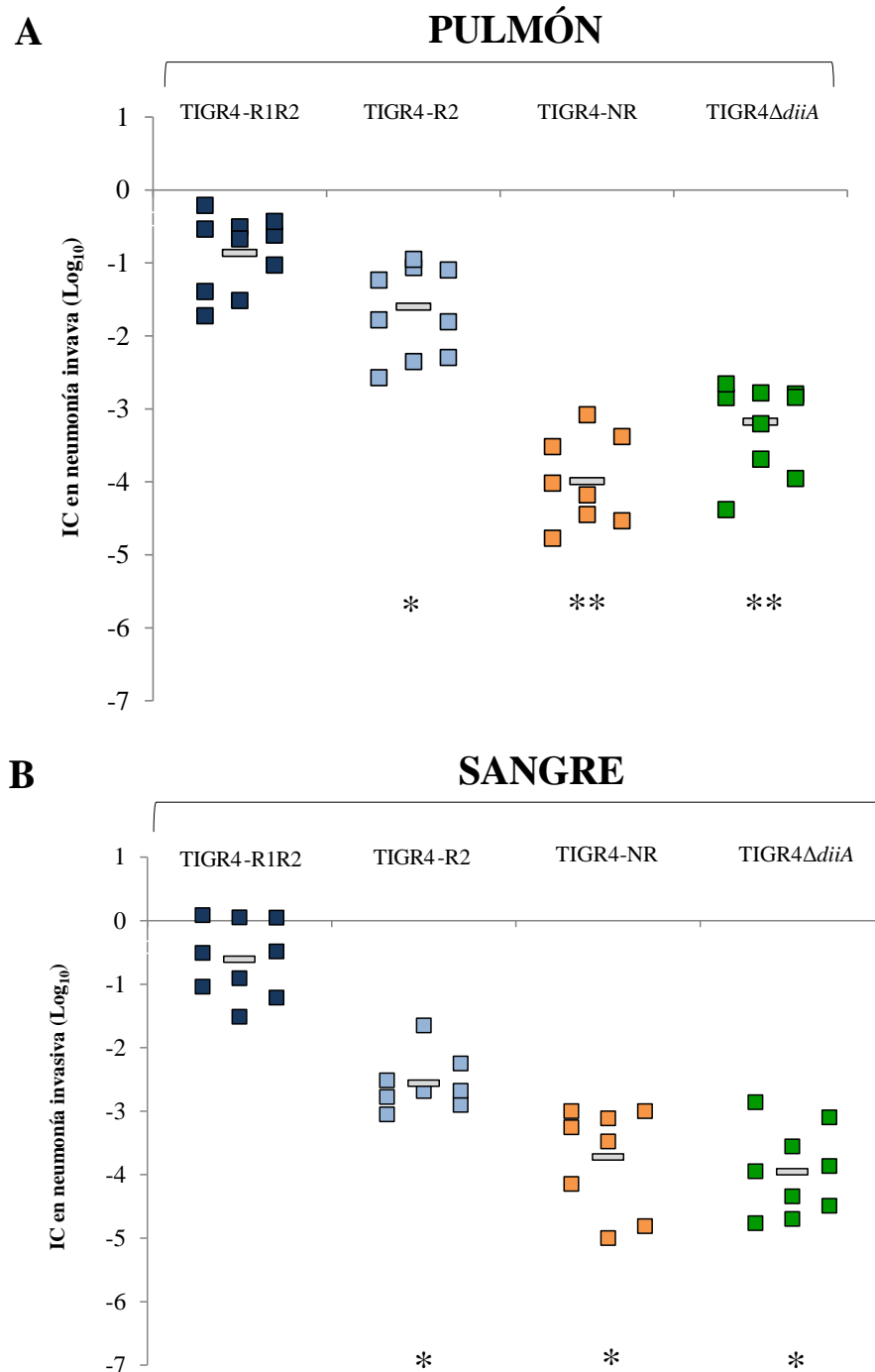


Figura 20. Determinación de la virulencia de los mutantes en DiiA utilizando un modelo murino de neumonía invasiva. Se representan los valores de los índices de competitividad (IC) de los mutantes en muestra de pulmón (A) y sangre (B). Cada cuadrado representa un ratón, mientras que las barras horizontales representan la media. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3.1.3. Papel de DiiA en sepsis

Finalmente, la cantidad de bacteria recuperada de sangre tras inoculación IP de los mutantes TIGR4-R2 y TIGR4-NR fue significativamente menor respecto de la cepa TIGR4-R1R2 ($P = 1.8 \times 10^{-4}$ y $P = 2.8 \times 10^{-4}$, respectivamente; prueba t de Student). El

mutante de delección completo presentó un descenso drástico en virulencia hasta el punto de ser prácticamente indetectable en sangre ($IC < 10^{-5}$) (Figura 21).

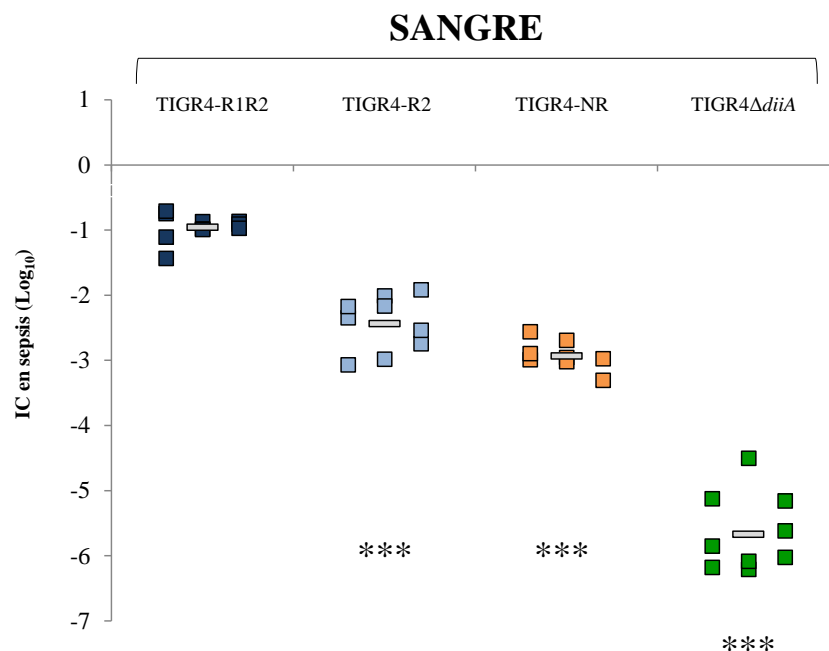


Figura 21. Determinación de la virulencia de los mutantes en DiiA utilizando un modelo murino de sepsis. Se representan los valores de los índices de competitividad (IC) de los mutantes en muestra de sangre. Cada cuadrado representa un ratón, mientras que las barras horizontales representan la media. ***: $P < 0.001$.

3.2. Unión de DiiA a biomoléculas del hospedador

Considerando la implicación de la proteína DiiA en patogénesis, se estudió la interacción con moléculas del hospedador mediante SPR. Para ello, se inmovilizaron en chips independientes las proteínas purificadas DiiA-R1R2 y DiiA-NR en una cantidad que producía 55.0 UR. Utilizando estos chips, se cuantificó la unión a ocho moléculas de matriz extracelular y cuatro proteínas séricas de mamíferos presentes en el hospedador. Diez moléculas mostraron una unión débil ($UR \leq 3$) en los dos chips, semejante a la obtenida para el control BSA (Figura 22). Sin embargo, Clg y hLf se unieron a ambas versiones de DiiA dando una señal muy alta ($UR > 50$) (Figura 22). Este dato indicaba que la región del tallo de DiiA era la que interacciona con Clg y hLf.

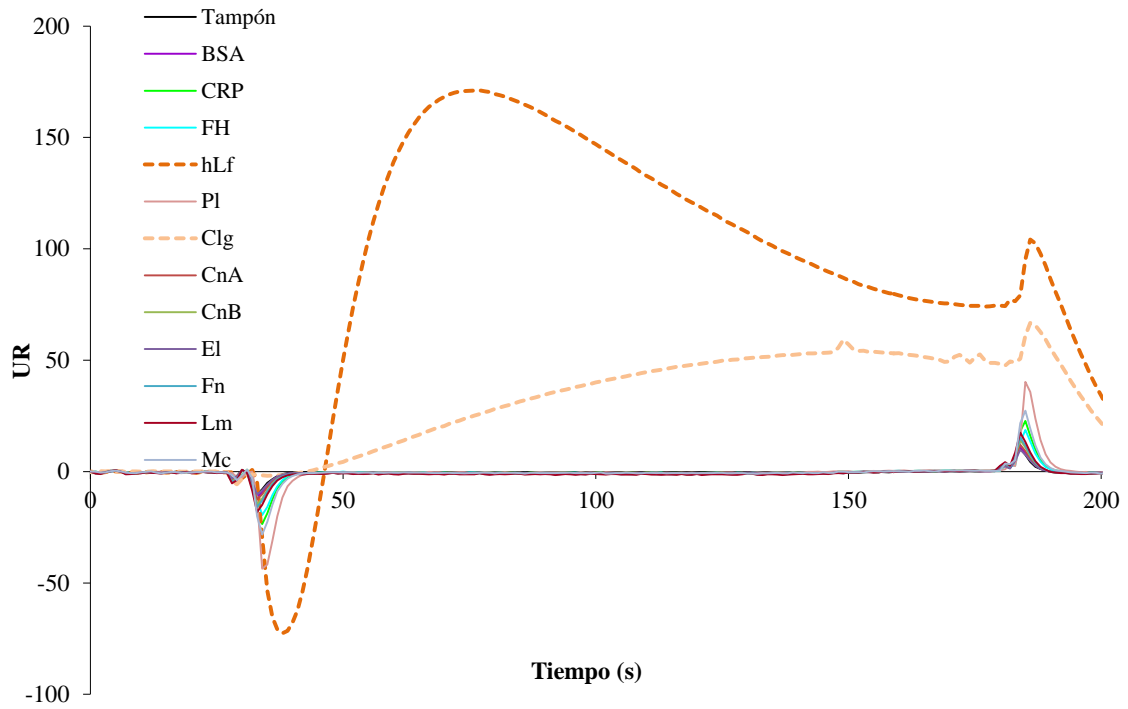


Figura 22. Interacción entre DiiA-R1R2 y las moléculas del hospedador medidas mediante resonancia de plasmones de superficie. UR: unidades de respuesta.

Además, se probaron diferentes concentraciones de Clg y hLf para caracterizar cinéticamente en detalle la unión a DiiA. Este análisis de cuantificación mostró que Clg y hLf se unían a DiiA con unos valores de K_D de 4.6×10^{-7} ($UR^2 = 1.59$; análisis Chi-cuadrado) y 2.7×10^{-9} ($UR^2 = 1.21$; análisis Chi-cuadrado), respectivamente (Figura 23). Este experimento se llevó a cabo con ambos chips, siendo los valores de afinidad prácticamente idénticos en ambos casos. Clg y hLf se unen, por tanto, con una afinidad específica típica de factores de virulencia (Voss *et al.*, 2013) (Binsker *et al.*, 2017).

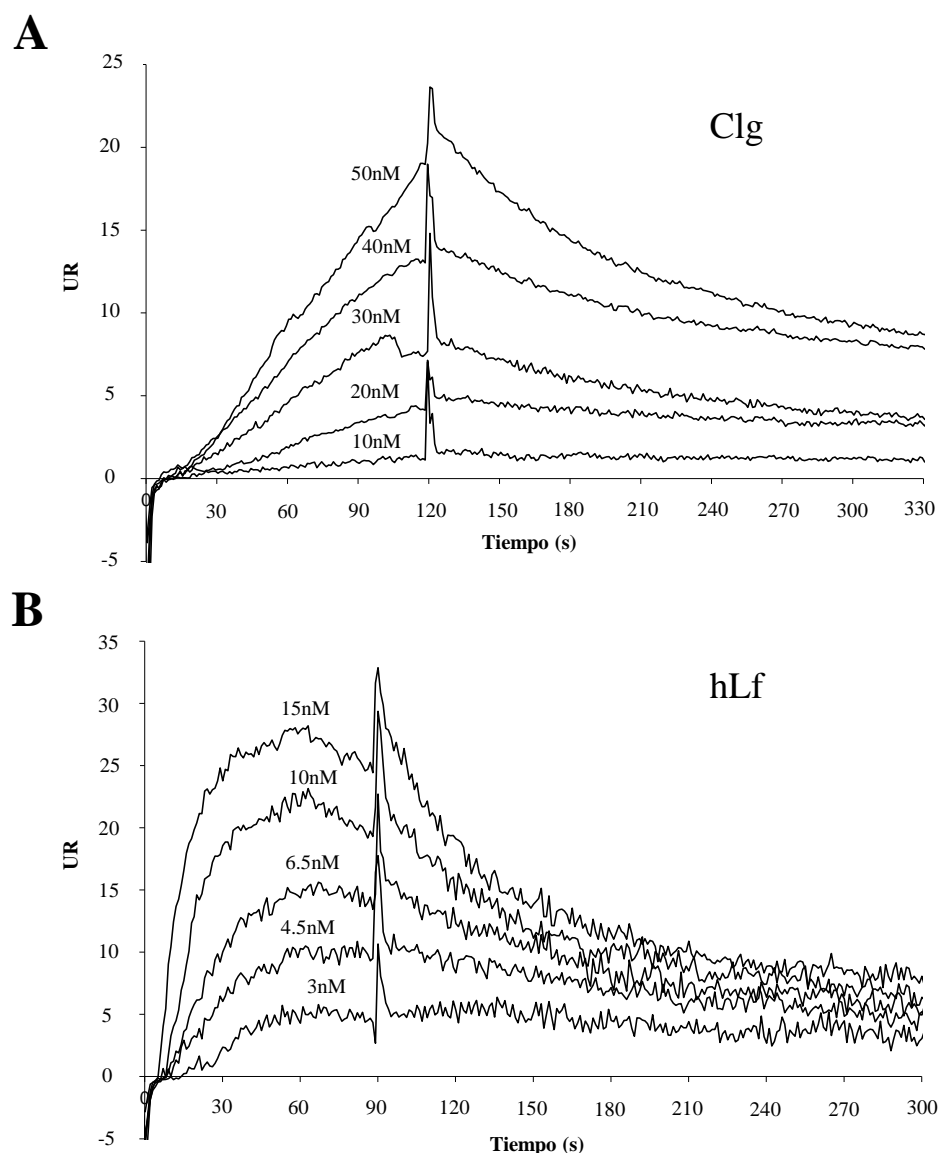


Figura 23. Interacción de DiiA-R1R2 con proteínas del hospedador por resonancia de plasmones de superficie. Múltiples ciclos de unión a colágeno (Cl) (A) y hololactoferrina (hLf) (B) durante 120 y 90 s, respectivamente. Las concentraciones de Cl y hLf están indicadas. UR: unidades de resonancia.

3.3. Participación de DiiA en la evasión del sistema inmunitario

Puesto que una actividad a distintos niveles se ha descrito para varios factores de virulencia de neumococo, incluida la interacción con el sistema del complemento (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015), se planteó la hipótesis de que DiiA también pudiera presentar este rasgo. En primer lugar se analizó si DiiA participaba directamente en la evasión de la inmunidad mediada por el sistema del complemento. Para ello se estudió el reconocimiento por el componente C3b en las cepas TIGR4 y TIGR4 Δ diiA. Sin embargo, no se observaron diferencias en el depósito de C3b entre las dos cepas (Figura 24).

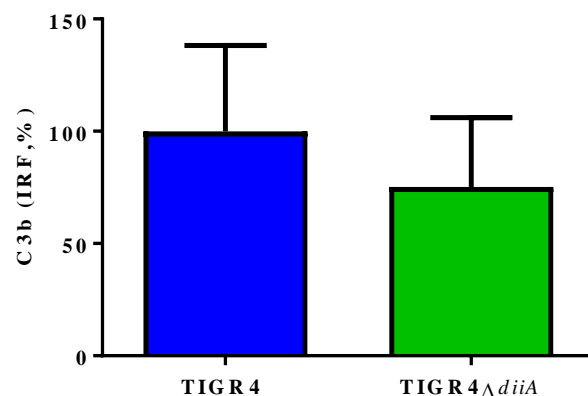


Figura 24. Depósito de C3b sobre las cepas TIGR4 y TIGR4 Δ diiA. Las barras de error representan la desviación estándar.

A pesar de ello y para describir la posible implicación de Lf en el depósito de C3b sobre la bacteria como ya se había descrito previamente (Rainard, 1993), se llevaron a cabo ensayos en los que se utilizaron distintas concentraciones de aLf y hLf. Como control positivo, se utilizó el mutante de delección Δ pspA, ya que se ha caracterizado la interacción entre Lf y esta proteína (Hammerschmidt *et al.*, 1999; Shaper *et al.*, 2004). Sin embargo, la presencia de aLf no modificó la cantidad de C3b sobre ninguna de las cepas de manera significativa (Figura 25).

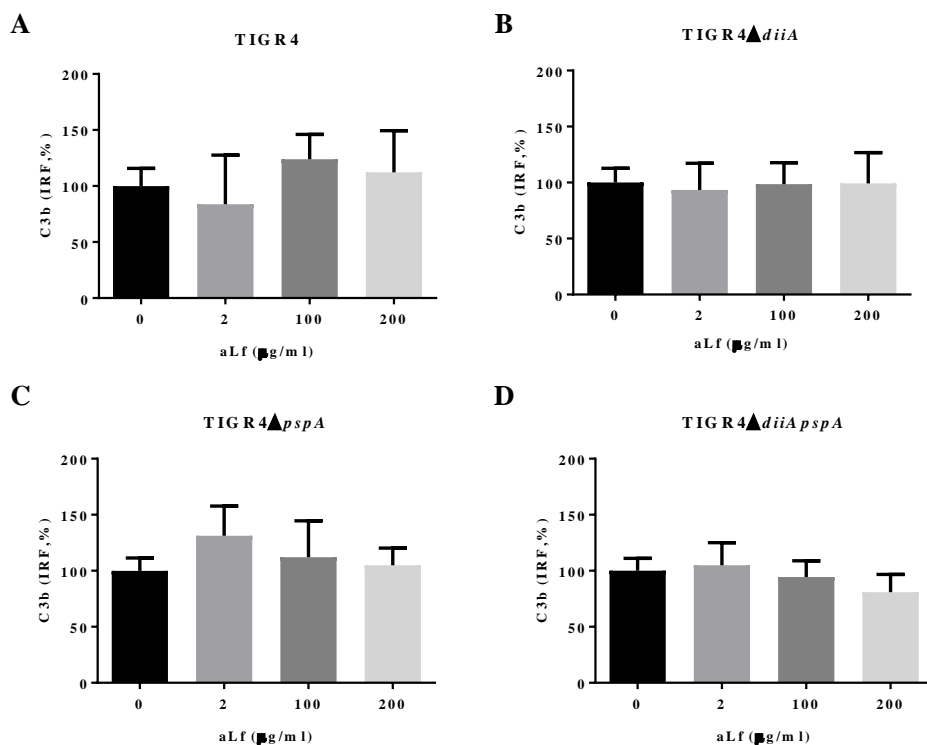


Figura 25. Reconocimiento de las cepas TIGR4 silvestre (A), TIGR4 Δ diiA (B), TIGR4 Δ pspA (C) y TIGR4 Δ diiApspA (D) por parte de C3b en presencia de apolactoferrina (aLf) a distintas concentraciones (μg/ml). Las barras de error representan la desviación estándar.

Por el contrario, la presencia de hLf redujo la acumulación de C3b sobre la cepa silvestre de manera estadísticamente significativa ($P < 0.01$; prueba t de Student) (Figura 21A). Este efecto se revirtió en los mutantes sencillos TIGR4 Δ diiA y TIGR4 Δ pspA así como en el mutante doble (Figura 26 B–D). Estos resultados confirman que la unión de neumococo a hLf a través de las proteínas DiiA y PspA permite evadir la inmunidad mediada por el sistema del complemento, contribuyendo así a la virulencia del microorganismo. Estos resultados son de gran interés, ya que la Lf se encuentra disponible tanto en el tracto respiratorio como en la circulación sistémica, por lo que la unión a esta proteína del hospedador serviría a neumococo para escapar al reconocimiento de un componente clave de la RII y RIA como es el sistema del complemento.

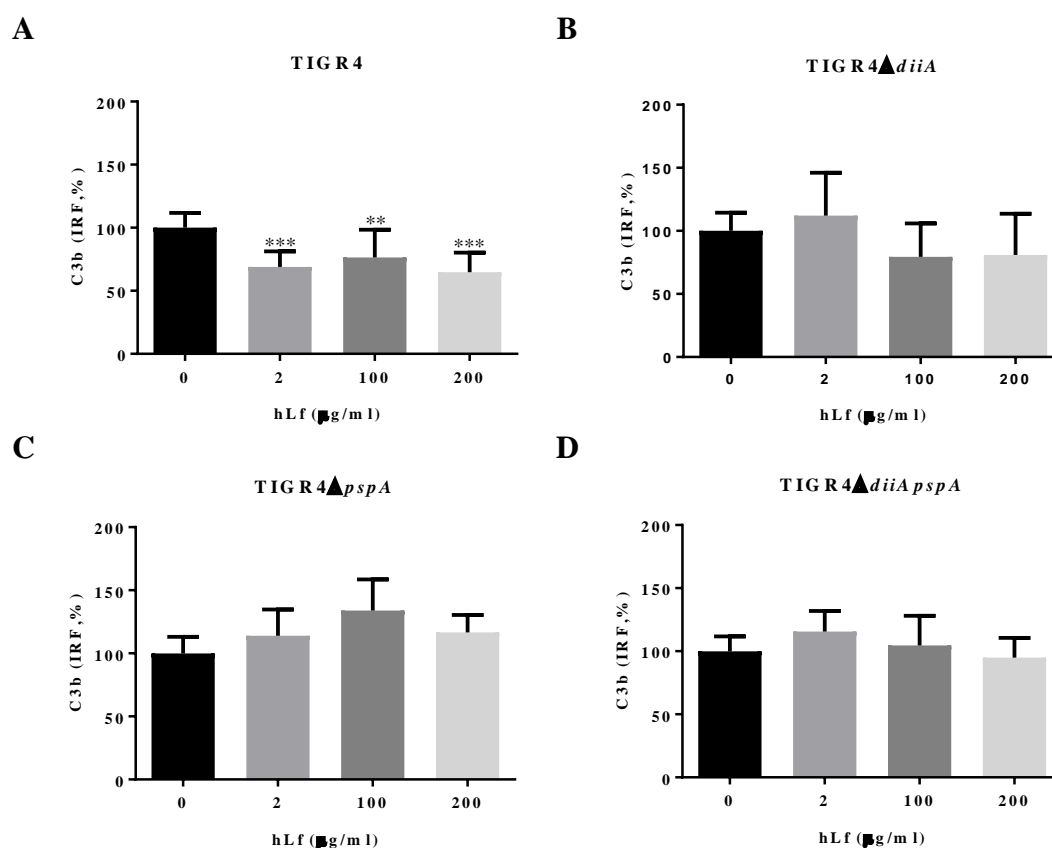


Figura 26. Reconocimiento de las cepas TIGR4 silvestre (A), TIGR4 Δ diiA (B), TIGR4 Δ pspA (C) y TIGR4 Δ diiApspA (D) por parte de C3b en presencia de hololactoferrina (hLf) a distintas concentraciones (µg/ml). Las barras de error representan la desviación estándar. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3.4. Interacción de *S. pneumoniae* con células del epitelio pulmonar mediada por DiiA

En primer lugar se comparó la adhesión a células A549 entre el mutante que contiene la versión completa de la proteína y el mutante carente de DiiA. Los resultados obtenidos mostraron una mayor interacción de neumococo con el epitelio pulmonar en ausencia de DiiA ($P < 0.001$) (Figura 27). Estas diferencias relacionadas con el menor reconocimiento de neumococo cuando DiiA está presente, por parte del epitelio pulmonar, pueden ser importantes desde una perspectiva inmunológica, ya que podría permitir a la bacteria evadir o al menos retrasar la activación celular del SI en el sitio de infección.

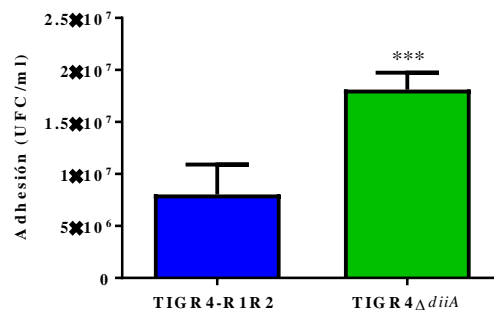


Figura 27. Adhesión de TIGR4-R1R2 y TIGR4ΔdiiA a células A549. Las barras de error representan la desviación estándar. ***: $P < 0.001$.

Puesto que la proteína DiiA está implicada en establecimiento de la neumonía neumocócica y en el proceso de diseminación a circulación sistémica desde el tracto respiratorio inferior, y teniendo en cuenta que la Lf se encuentra presente en las secreciones de esta localización (Jeffery, 1987), se estudió la implicación de DiiA a través de Lf en la interacción de neumococo con las células del epitelio pulmonar.

Cuando se repitieron los experimentos en presencia de aLf y hLf a distintas concentraciones, no se observaron diferencias en la capacidad de adhesión debido a la proteína DiiA en las cepas estudiadas (Figura 28). Estos resultados indican que la captación de Lf en cualquiera de sus dos versiones analizadas, no parece tener ningún efecto a nivel de la interacción de neumococo con el epitelio pulmonar.

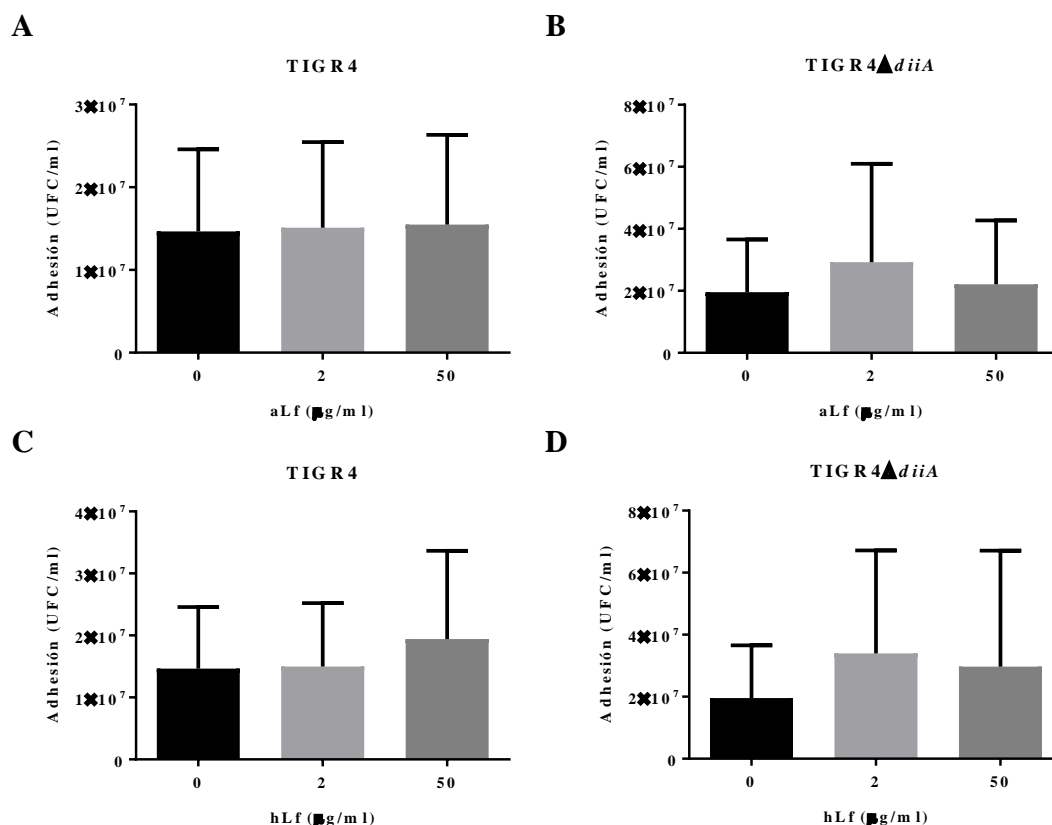


Figura 28. Adhesión de las cepas TIGR4 (A, C) y TIGR4ΔdiiA (B, D) a células A549 previa exposición a apolactoferrina (aLf) y hololactoferrina (hLf) en distintas concentraciones. Las barras de error representan la desviación estándar.

4. RESPUESTA INMUNOGENICA GENERADA POR DiiA

Las proteínas de superficie de neumococo implicadas en virulencia constituyen posibles antígenos vacunales empleados en el desarrollo de vacunas alternativas frente a neumococo (Kono *et al.*, 2011; Ricci *et al.*, 2011). De hecho, la proteína DiiA cumple los principales requisitos aceptables para desarrollar una respuesta inmunitaria protectora con fines biomédicos: (1) ser una proteína de superficie; (2) formar parte del genoma núcleo de la especie; (3) mostrar baja variabilidad alélica; (4) estar implicada en procesos de virulencia; y (5) ser inmunogénica. Para evaluar el potencial de la proteína DiiA como uno de estos antígenos, se estudió la capacidad inmunogénica a distintos niveles tanto de la proteína completa como de su versión sin repeticiones.

4.1. Predicción *in silico* de la inmunogenicidad de DiiA

En primer lugar se llevó a cabo un análisis basado en vacunología reversa para conocer los posibles epítopos de DiiA. Según NetTepi, SVMTriP, GenScript y el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar, el área de las repeticiones contenía entre el 50 y el

100% de los residuos implicados en inmunogenicidad, mientras que para BepiPred-2.0 la predicción era solo del 35% (Figura 29). Sin embargo, las repeticiones mostraron una inmunogenicidad 2.2 veces superior respecto a lo esperado tras normalizar por longitud ($P < 0.001$; análisis de Chi-cuadrado), quizá debido a que esta zona era también menos hidrófila que la región NR.

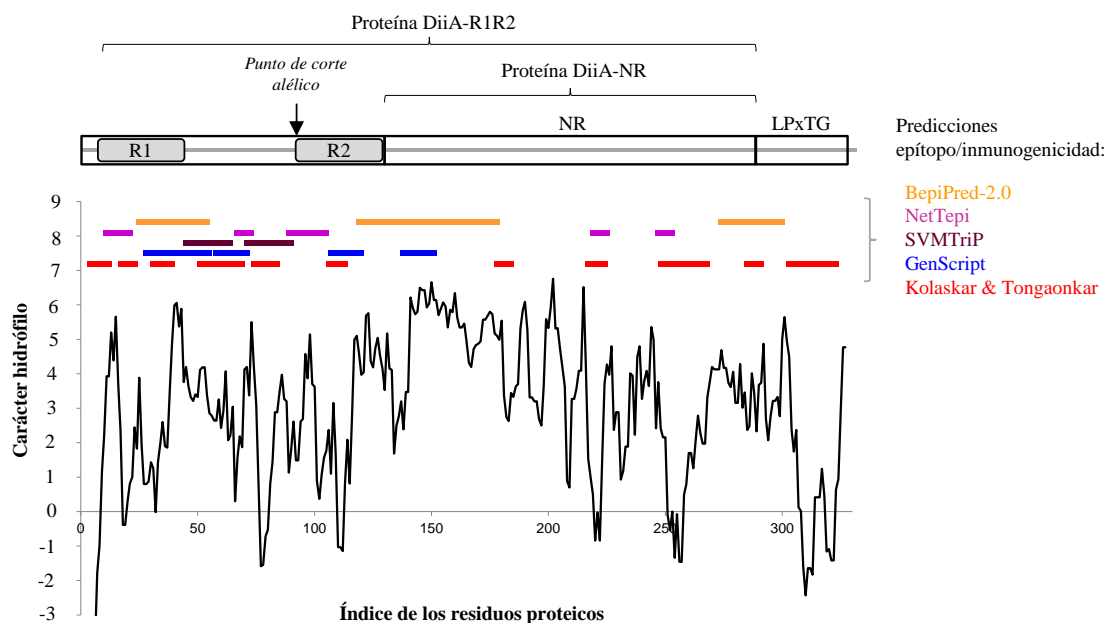


Figura 29. Organización de los dominios de DiiA y de sus predicciones epítopo/inmunogenicidad.

4.2. Respuesta de inmunoglobulinas tras inmunización intraperitoneal

Para confirmar experimentalmente estas predicciones, se inmunizó a ratones por vía IP con 10 μ g de DiiA-R1R2 o DiiA-NR, y se cuantificó su reactividad frente a las variantes DiiA-R1R2, DiiA-R2 y DiiA-NR mediante ELISA (Figura 30). Como controles, se tomaron los sueros de ratones no tratados o tratados solo con el adyuvante. En todos los casos los valores del suero de animales tratados solo con el adyuvante fue prácticamente idéntico al del suero de los ratones no tratados, lo que indicaba que el hidróxido de aluminio no estimuló significativamente la producción de inmunoglobulinas por sí mismo (Corsini *et al.*, 2016). Por otro lado, los valores de inmunoglobulinas de tipo IgG del suero de animales tratados solo con el adyuvante fueron significativamente inferiores a los del suero de los ratones inmunizados bien con DiiA-R1R2 o con DiiA-NR viéndose afectadas todas las subclases. A su vez, los sueros de los ratones inmunizados con DiiA-R1R2 presentaron valores significativamente superiores - principalmente para IgG2a, IgG2b e IgG3 - a los sueros de los ratones

inmunizados con DiiA-NR ($P < 0.01$; prueba t de Student). Por lo tanto, las repeticiones ejercían un efecto inmunomodulador en la producción de anticuerpos. Es importante destacar además que se observó reactividad cruzada entre el suero de los ratones inmunizados con DiiA-R1R2 y la proteína truncada DiiA-R2.

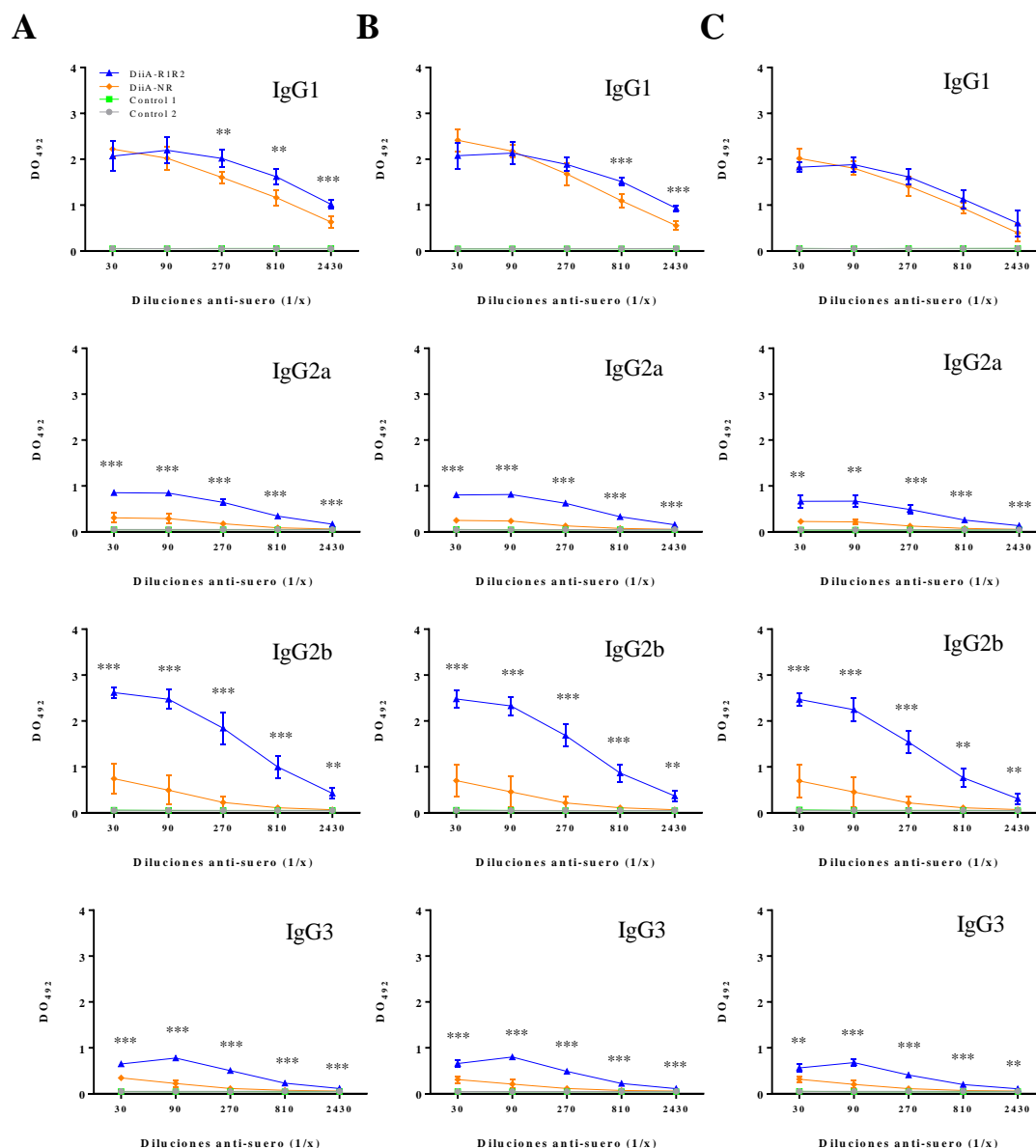


Figura 30. Capacidad de unión de los anticuerpos generados tras la inmunización IP con 10 µg/dosis de las proteínas recombinantes purificadas de DiiA a las propias variantes. Reconocimiento de DiiA-R1R2 (columna A), DiiA-R2 (columna B) y DiiA-NR (columna C) por tipos y subtipos de IgG. Los asteriscos hacen referencia a la comparación estadística entre ratones inmunizados con DiiA-R1R2 (línea azul) y con DiiA-NR (línea naranja). Control 1 (línea verde), suero de ratones tratados solo con adyuvante; Control 2 (línea gris) suero de ratones no tratados. Las barras de error representan la desviación estándar. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

La capacidad del suero para reconocer a DiiA se verificó mediante *western blot*. El anti-suero fue capaz de reconocer 16 nanogramos de la variante DiiA-R1R2 purificada,

una cantidad equivalente a un reconocimiento sensible de los anticuerpos por esta técnica en condiciones estándar (Figura 31).

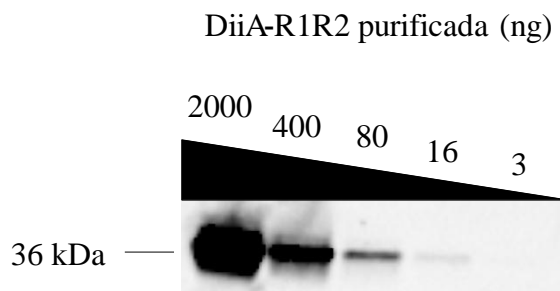


Figura 31. Western blot de diluciones 1:5 seriadas de proteína purificada testada con suero de ratón inmunizado con DiiA-R1R2 a una dilución 1/500.

4.3. Funcionalidad de los anticuerpos generados tras inmunización intraperitoneal

Teniendo en cuenta que la inmunización IP con DiiA produce anticuerpos que reconocen DiiA-R1R2, el siguiente objetivo fue determinar si estos anticuerpos producidos eran funcionalmente activos para activar el sistema del complemento. Para ello, se incubaron distintas cepas de neumococo en presencia de suero de ratones tratados solo con el adyuvante y suero de ratones inmunizados con variantes de DiiA. En dos de las tres cepas, la presencia de los sueros de ratones inmunizados incrementó el depósito de C3b sobre la superficie bacteriana de manera significativa ($P < 0.01$ para la cepa TIGR4 y $P < 0.001$ para la cepa 48; prueba t de Student) (Figura 32A, B). Esto indicaba que la inmunización con la proteína DiiA favorecía la activación del sistema del complemento en cepas que poseían el alelo largo. La excepción fue en la cepa 957 perteneciente al serotipo 3 (Figura 32C).

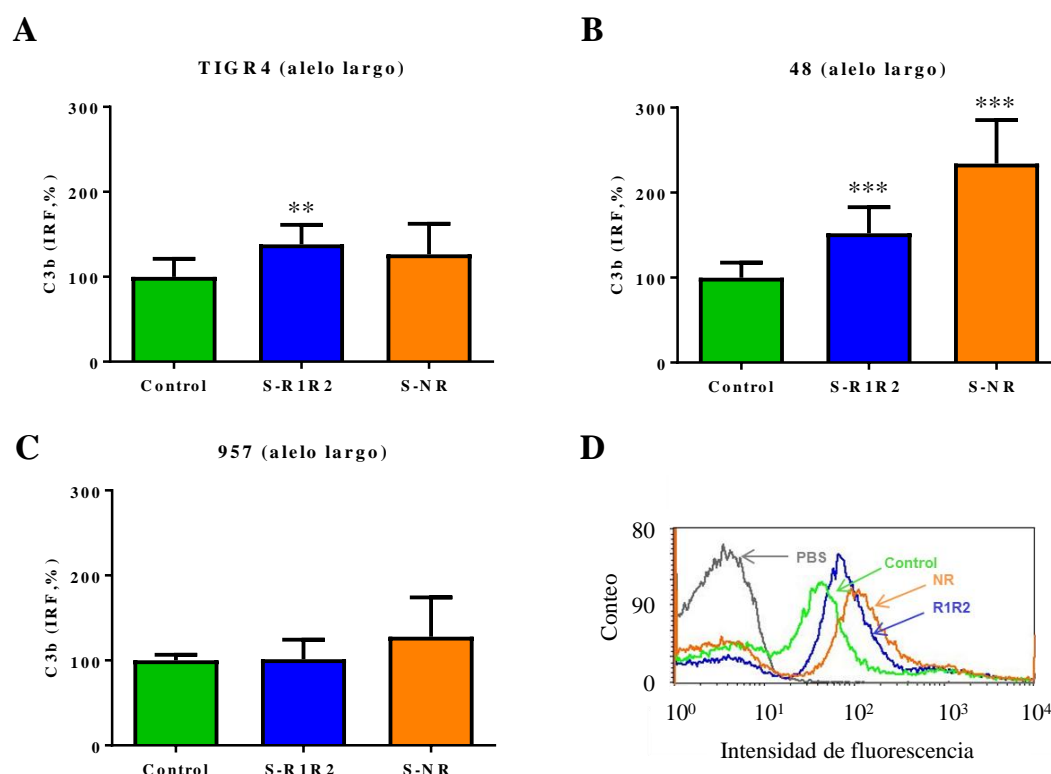


Figura 32. Depósito del componente C3b del complemento sobre la superficie bacteriana en presencia de distintos sueros de ratón. Se representan los valores de citometría de flujo como porcentaje del índice relativo de fluorescencia (IRF) para las cepas TIGR4 de serotipo 4 (A), 48 de serotipo 23F (B) y 957 de serotipo 3 (C). A modo de ejemplo se presenta un histograma de la cepa 48 (D). Las barras de error representan la desviación estándar. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

4.4. Repuesta inmunitaria a nivel celular tras inmunización intraperitoneal

La activación de la respuesta celular es importante como mecanismo de defensa frente a la infección neumocócica (Marques *et al.*, 2012; Khan y Pichichero, 2013; Van Maele *et al.*, 2014). Por ello se llevó a cabo un recuento de linfocitos CD-3, CD-4 y CD-8 del bazo de ratones no tratados, tratados con solo con el adyuvante e inmunizados con DiiA-R1R2. Los resultados confirmaron que la inmunización con la proteína DiiA no afectaba a la proporción de diferentes poblaciones de células T en comparación con los ratones no tratados o tratados solo con el adyuvante (Figura 33).

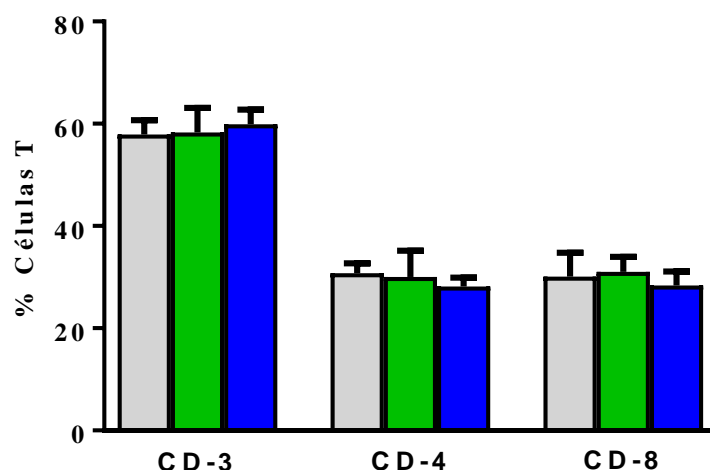


Figura 33. Porcentaje de células T en respuesta a la inmunización con DiiA. La respuesta se representa como la proporción de linfocitos CD3, CD4 y CD8 en ratones no tratados (barras grises), tratados con aluminio (barras verdes) e inmunizados con R1R2 (barras azules). Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos corresponden a tres experimentos independientes.

4.5. Respuesta de inmunoglobulinas tras inmunización intranasal

Considerando que la inmunización IN con otras proteínas de *S. pneumoniae* induce la producción de inmunoglobulinas a nivel de mucosas (Khan y Pichichero, 2013) y que se había confirmado la actividad antigénica de DiiA en suero, se analizaron los niveles de IgG totales e IgA en el LNF en ratones inmunizados por vía IN. Para ello, se llevó a cabo un lavado nasofaríngeo en los ratones 7 días después de la última dosis de inmunización. Estas muestras se analizaron por ELISA para evaluar su reactividad cruzada con las distintas variantes purificadas de DiiA. En términos generales, los niveles de Ig fueron más modestos tras la inmunización IN ($DO_{492} < 0.5$) que tras la inmunización IP ($DO_{492} < 3$). Los niveles de anticuerpos presentes en el LNF de los animales tratados solo con el adyuvante o inmunizados con DiiA-NR fueron prácticamente indetectables. Sin embargo, la inmunización con DiiA-R1R2 dio lugar a niveles de IgG totales e IgA significativamente superiores a los obtenidos tras la inmunización con DiiA-NR a dilución 1/270 o más concentradas (Figura 34).

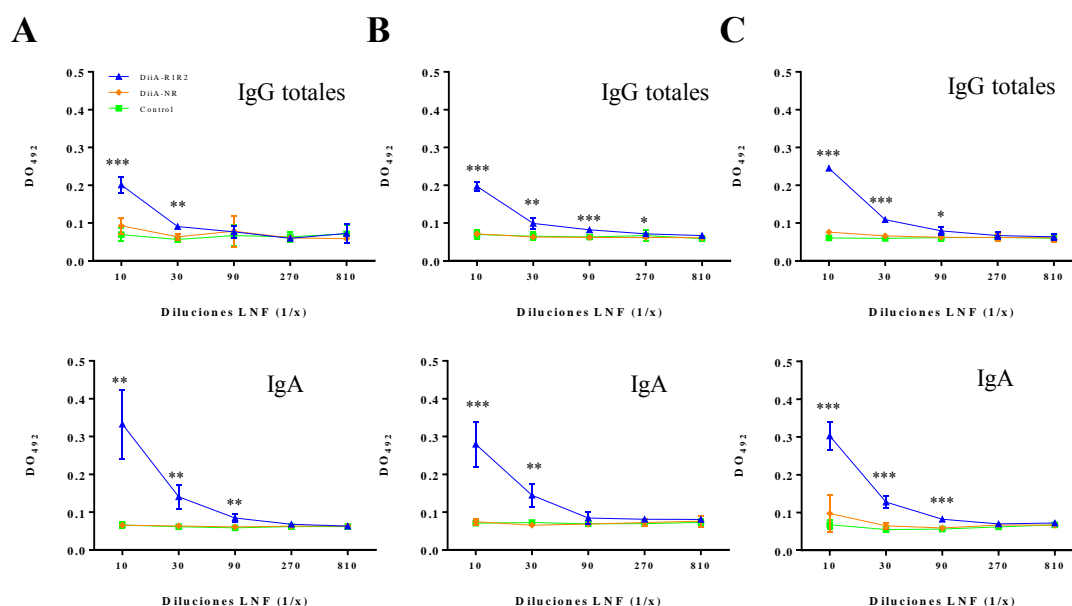


Figura 34. Capacidad de unión de los anticuerpos generados tras la inmunización IN con 20 µg/dosis de las proteínas recombinantes de DiiA a las mismas variantes. Reconocimiento de DiiA-R1R2 (columna A), DiiA-R2 (columna B) y DiiA-NR (columna C) por IgG totales e IgA. Los asteriscos hacen referencia a la comparación estadística entre ratones inmunizados con DiiA-R1R2 (línea azul) y con DiiA-NR (línea naranja). El grupo de ratones tratados solo con el adyuvante fue utilizado como grupo control (línea verde). Las barras de error representan la desviación estándar. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

5. EVALUACIÓN DE LA INMUNOPROTECCIÓN CONFERIDA POR DiiA

5.1. Protección frente a sepsis por *S. pneumoniae* tras inmunización intraperitoneal

Una vez confirmada la inmunogenicidad de DiiA a nivel sistémico con las distintas variantes de DiiA, se llevaron a cabo ensayos para determinar la actividad protectora en animales. En el caso de TIGR4 se utilizó una primera pauta de inmunización con 10 µg/dosis, igual a la que se utilizó para determinar los niveles de anticuerpos en suero. Se obtuvo así una supervivencia del 20% a los 7 días en los grupos de ratones inmunizados con DiiA-R1R2 y DiiA-NR aunque la diferencia fue estadísticamente significativa solo para el grupo de ratones inmunizados con DiiA-NR ($P = 0.038$; prueba log-rank de Mantel-Cox) (Figura 35A). Además, el número de bacterias en sangre a las 24 h fue significativamente menor ($P = 0.003$; prueba t de Student) en aquellos ratones inmunizados con DiiA-NR respecto al grupo de ratones tratados solo con el adyuvante (Figura 35B).

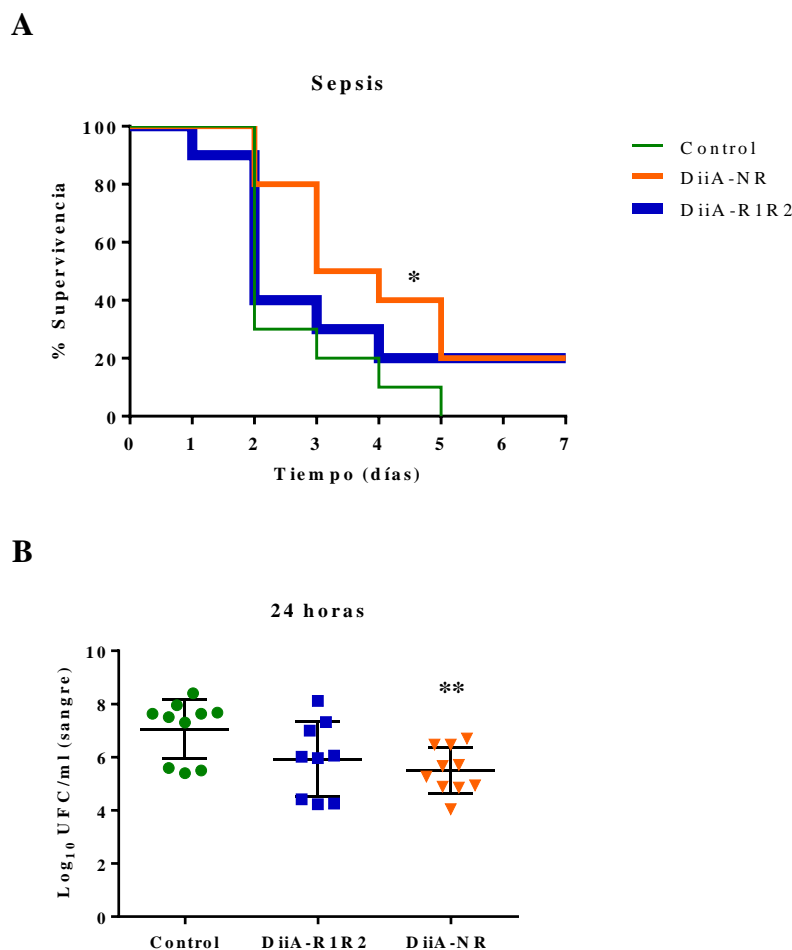


Figura 35. Protección frente a la sepsis neumocócica producida por la cepa TIGR4 (serotipo 4) mediante inmunización por vía IP con 10 µg/dosis de DiiA. (A) Curva de supervivencia de ratones vacunados y posteriormente infectados. (B) Recuento de bacterias viables recuperadas de sangre. Cada símbolo del diagrama se corresponde con un ratón, de tal manera que los círculos en verde representan ratones tratados solo con el adyuvante, los cuadrados en azul ratones inmunizados con DiiA-R1R2 y los triángulos en naranja ratones inmunizados con DiiA-NR. El grupo de ratones tratados solo con el adyuvante fue utilizado como grupo control. Dosis letal utilizada de la cepa TIGR4 1.25×10^5 UFC/ratón. Las barras de error representan la desviación estándar. **, $P < 0.01$.

Debido a la limitada respuesta protectora obtenida con la pauta de 10 µg/dosis, se incrementó la cantidad de proteína por dosis, algo que ya se había realizado en otros estudios con resultados satisfactorios (Corsini *et al.*, 2016). Al duplicar la cantidad de proteína utilizada para la inmunización, el grado de protección en los ratones inmunizados con DiiA-R1R2 se incrementó hasta el 80% a las 48h y el 60% a las 120h ($P = 0.0009$; prueba log-rank de Mantel-Cox) (Figura 36A). Este nivel de protección es similar al obtenido con otras proteínas aceptadas como inmunoprotectoras frente a neumococo (Glover *et al.*, 2008). Además, en el grupo de ratones inmunizados con DiiA-R1R2 se redujo el número de bacterias en sangre a las 24 h de forma significativa respecto al grupo control ($P = 0.012$; prueba *t* de Student) (Figura 36B). Este efecto se

ha descrito para otras proteínas combinadas con el mismo adyuvante (Gianfaldoni *et al.*, 2007). En resumen, la capacidad protectora de DiiA-R1R2 frente a sepsis neumocócica por la cepa TIGR4 era dependiente de dosis.

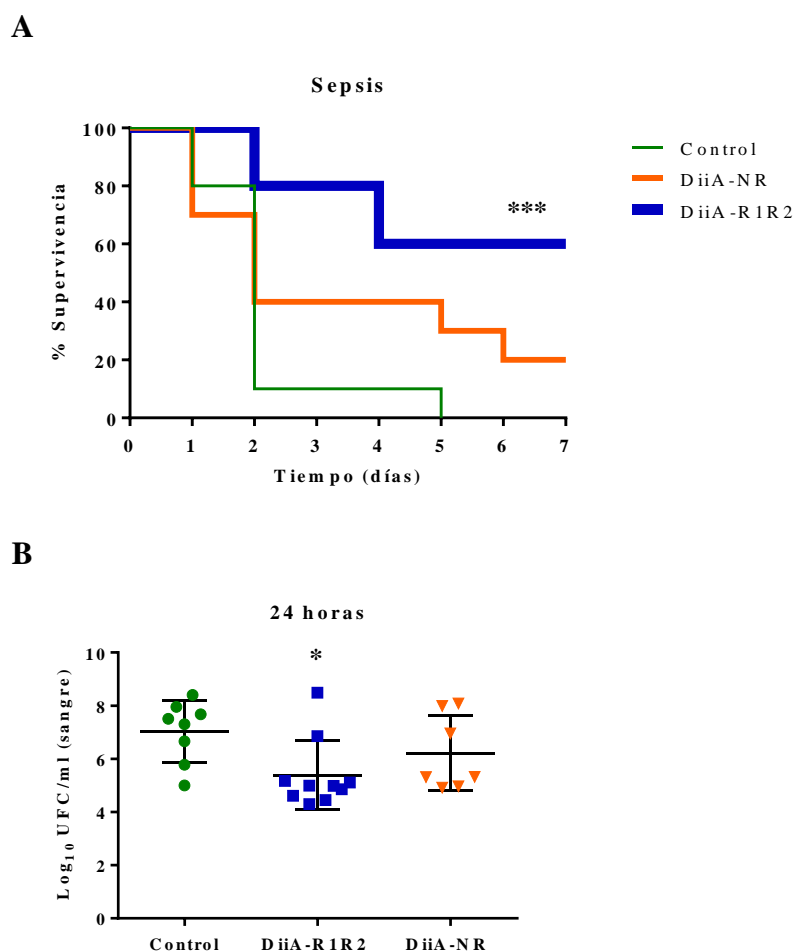


Figura 36. Protección frente a la sepsis neumocócica producida por la cepa TIGR4 (serotipo 4). A: Curva de supervivencia de ratones infectados tras inmunización IP con 20 µg/dosis. B: Recuento de bacterias viables recuperadas de sangre. Cada símbolo del diagrama se corresponde con un ratón, de tal manera que los círculos en verde representan ratones tratados solo con el adyuvante, los cuadrados en azul ratones inmunizados con DiiA-R1R2 y los triángulos en naranja ratones inmunizados con DiiA-NR. El grupo de ratones tratados solo con el adyuvante fue utilizado como grupo control. Dosis letal utilizada de la cepa TIGR4 1.25×10^5 UFC/ratón. Las barras de error representan la desviación estándar. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Teniendo en cuenta los resultados positivos obtenidos con 20 µg/dosis de DiiA-R1R2 frente a la cepa TIGR4, se volvieron a inmunizar ratones solo con esta variante de la proteína con el propósito de estudiar si el efecto protector era extrapolable a otros linajes de neumococo. La sepsis con la cepa 48 (serotipo 23F) fue letal a las 30 h (Figura 37A) y únicamente se pudo observar un descenso de UFC estadísticamente significativo en el grupo inmunizado a las 6 horas ($P = 0.018$; prueba *t* de Student) (Figura 37B).

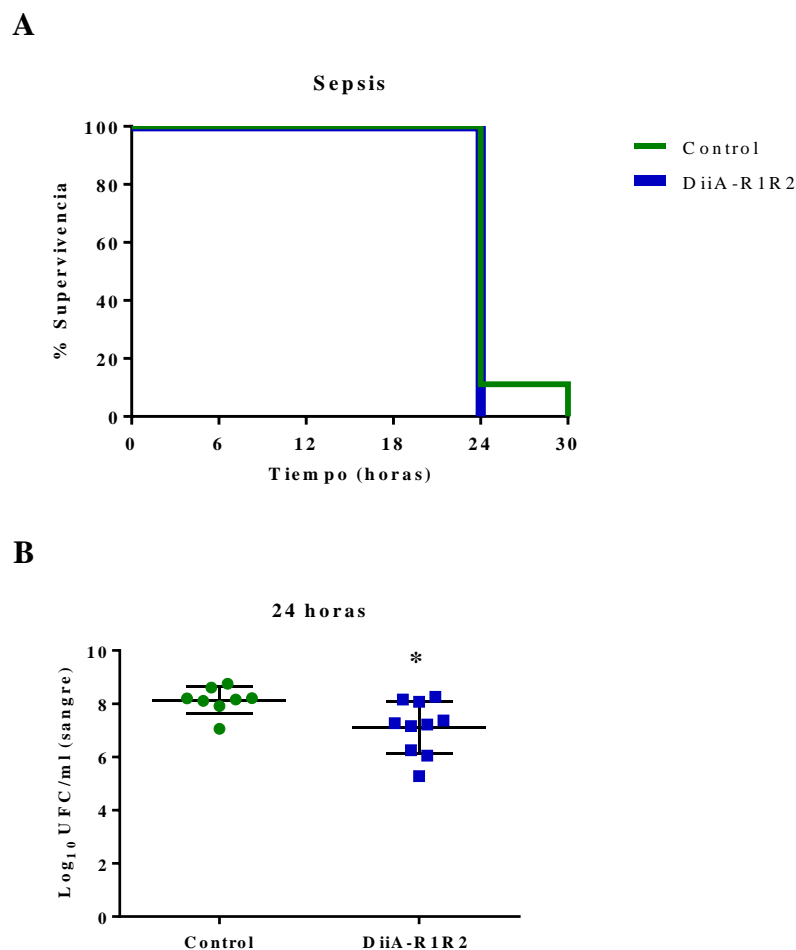


Figura 37. Protección frente a la sepsis neumocócica producida por la cepa 48 (serotipo 23F). A: Curva de supervivencia de ratones infectados tras inmunización IP 20 µg/dosis. B: Recuento de bacterias viables recuperadas de sangre. Cada símbolo del diagrama se corresponde con un ratón, de tal manera que los círculos en verde representan ratones tratados solo con el adyuvante y los cuadrados en azul ratones inmunizados con DiiA-R1R2. El grupo de ratones tratados solo con el adyuvante fue utilizado como grupo control. Dosis letal utilizada de la cepa 48: 1×10^8 UFC/ratón. Las barras de error representan la desviación estándar. *, $P < 0.05$.

5.2. Protección frente a neumonía bacteriémica por *S. pneumoniae* tras inmunización intraperitoneal

Neumococo es la primera causa de neumonía adquirida en la comunidad, con un elevado coste social y económico para los sistemas nacionales de salud. Con el objetivo de prevenir este tipo de infección y en base a los resultados obtenidos en sepsis para TIGR4, se analizó la capacidad protectora de DiiA frente a la neumonía bacteriémica por dicha cepa. Tras una pauta IP con 20 µg/dosis de DiiA-R1R2, no se obtuvo protección a los 7 días (Figura 38A). Además, aunque a las 24 h se observó un 20% más de supervivencia en el grupo de ratones inmunizados con DiiA-R1R2 en comparación

con el grupo de ratones control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de bacterias en sangre a este tiempo cuando se compararon los dos grupos de estudio ($P = 0.903$; prueba t de Student) (Figura 38B). Estos datos indicaban que DiiA no protegía frente a la neumonía bacteriémica, al menos bajo las condiciones testadas.

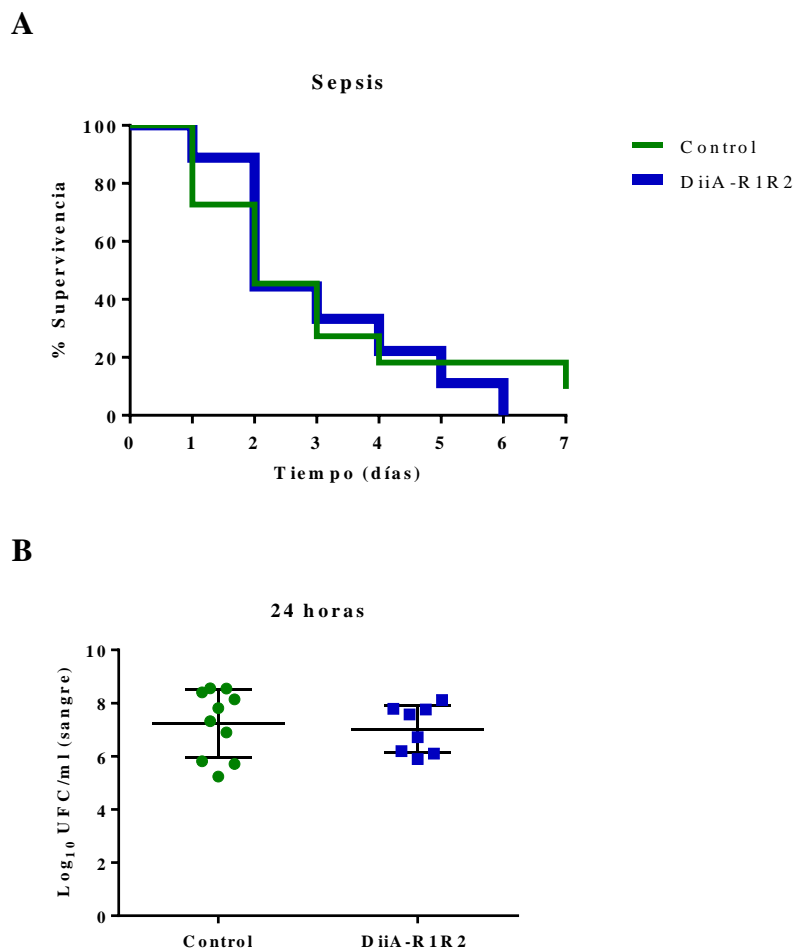


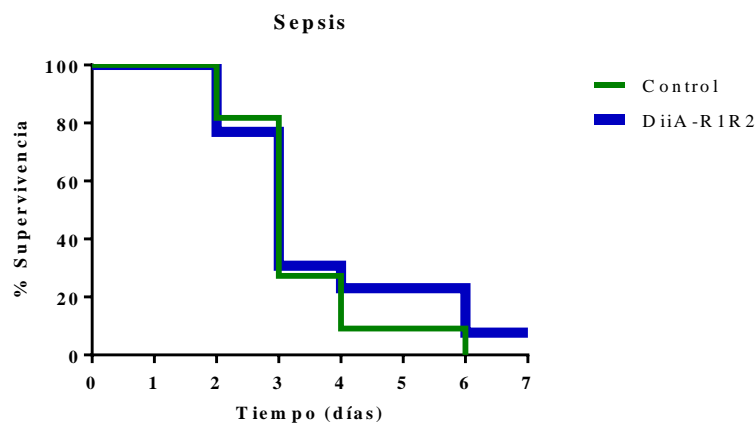
Figura 38. Protección frente a la neumonía bacteriémica producida por la cepa TIGR4 (serotipo 4). A: Curva de supervivencia de ratones infectados tras inmunización IP con 20 µg/dosis. B: Recuento de bacterias viables recuperadas de sangre. Cada símbolo del diagrama se corresponde con un ratón, de tal manera que los círculos en verde representan ratones tratados solo con el adyuvante y los cuadrados en azul ratones inmunizados con DiiA-R1R2. El grupo de ratones tratados solo con el adyuvante fue utilizado como grupo control. Dosis infectiva utilizada de la cepa TIGR4 8.4×10^8 UFC/ml. Las barras de error representan la desviación estándar.

5.3. Protección frente a neumonía bacteriémica por *S. pneumoniae* tras inmunización intranasal

Para mejorar los resultados obtenidos en el apartado anterior y tras observar que la inmunización IN generaba una respuesta de anticuerpos a nivel de mucosas, se estudió la posibilidad de protección frente a neumonía bacteriémica en ratones previamente

inmunizados por la vía IN. Para ello, se infectaron ratones según el modelo de neumonía bacteriémica con TIGR4 a los que se había sometido previamente a la pauta de inmunización de 20 µg/dosis/ratón. Sin embargo, en este caso solo se obtuvo un 10% de supervivencia en los ratones inmunizados con DiiA-R1R2 (Figura 39A) y además no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de bacterias en sangre a las 24 h ($P = 0.815$; prueba t de Student) (Figura 39B). Estos resultados indicaban que la inoculación de DiiA no confería protección frente a neumonía bacteriémica, al menos a dosis de 20 µg.

A



B

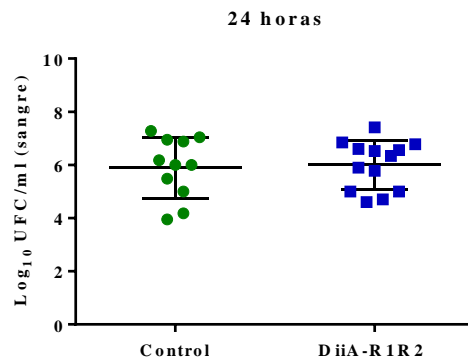


Figura 39. Protección frente a la neumonía bacteriémica producida por la cepa TIGR4 (serotipo 4). A: Curva de supervivencia de ratones infectados tras inmunización IN con 20 µg/dosis. B: Recuento de bacterias viables recuperadas de sangre. Cada símbolo del diagrama se corresponde con un ratón, de tal manera que los círculos en verde representan ratones tratados solo con el adyuvante y los cuadrados en azul ratones inmunizados con DiiA-R1R2. El grupo de ratones tratados solo con el adyuvante fue utilizado como grupo control. Dosis infectiva utilizada de la cepa TIGR4 8.4×10^8 UFC/ml. Las barras de error representan la desviación estándar.

5.4. Protección frente a colonización por *S. pneumoniae* tras inmunización intranasal

Teniendo en cuenta que en la mayoría de las cepas de *S. pneumoniae* el paso previo a la infección es la colonización (Simell *et al.*, 2012; Henriques-Normark y Toumanen, 2013) y que la inmunización IN con 20 µg/dosis/ratón del fragmento DiiA-R1R2 estimulaba la producción de inmunoglobulinas a nivel de nasofaringe, se analizó la capacidad de DiiA-R1R2 para disminuir el grado de colonización nasofaríngea mediante inmunización IN con esta pauta. Para ello, tras la vacunación con la proteína, se inoculó a los dos grupos de ratones con una dosis de la cepa TIGR4 que permitía colonización de la nasofaringe pero no infección sistémica (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Después de cinco días tras la inoculación con neumococo, los niveles bacterianos en el LNF de ratones inmunizados con DiiA-R1R2 (4.02 log/ml) disminuyeron en más de un orden de magnitud en comparación con el grupo control (2.97 log/ml) ($P = 0.039$, prueba t de Student) (Figura 40), en concordancia con estudios realizados con otras proteínas (Khan y Pichichero, 2013; Wu *et al.*, 2014). Es destacable que en dos de los ratones inmunizados con DiiA-R1R2 se erradicó por completo el estado de portador. Estos resultados indicaban que la inmunización IN con DiiA-R1R2 disminuía el grado de colonización por *S. pneumoniae* a nivel nasofaríngeo.

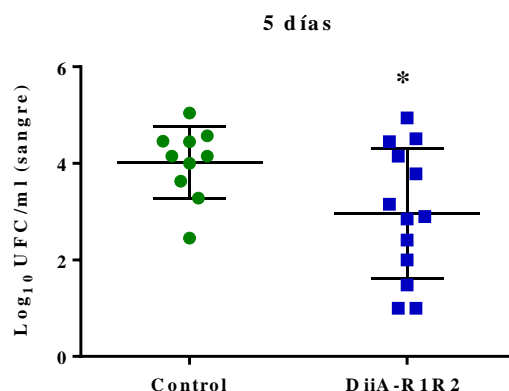


Figura 40. Recuento de bacterias viables recuperadas de la nasofaringe de los ratones colonizados con TIGR4 previa pauta de inmunización 20 µg/dosis. Cada símbolo del diagrama se corresponde con un ratón, de tal manera que los círculos en verde representan ratones tratados solo con el adyuvante y los cuadrados en azul ratones inmunizados con DiiA-R1R2. El grupo de ratones tratados solo con el adyuvante fue utilizado como grupo control. Dosis infectiva utilizada de la cepa TIGR4 2.8×10^6 UFC/ml. Las barras de error representan la desviación estándar. *, $P < 0.05$.

V. DISCUSIÓN

1. DiiA ES UNA ADHESINA ESPECÍFICA DE *S. PNEUMONIAE*

S. pneumoniae es uno de los patógenos humanos más importantes, siendo la principal causa de neumonía, meningitis, bacteriemia, sinusitis y otitis media aguda. La enfermedad neumocócica se produce cuando la bacteria, tras colonizar la nasofaringe, accede a otros órganos y desde éstos al torrente sanguíneo para alcanzar localizaciones más profundas. Las proteínas de superficie son importantes en distintas etapas de la patogénesis producida por *S. pneumoniae*.

En esta Tesis Doctoral se han analizado aspectos fundamentales y clínicos de una proteína de función desconocida codificada por el locus *sp1992* de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*, nombrada aquí como DiiA (*Dimorphic-invasive-involved-protein A*). Según análisis computacionales con bases de datos y experimentos moleculares con aislados clínicos, el gen *diiA* es específico de neumococo y presenta dos variantes alélicas de diferente longitud (993 o 744 pb), como las que se encuentran en las cepas TIGR4 y D39, codificando proteínas de 330 o 247 residuos, respectivamente. Una fuerte variabilidad alélica se ha descrito en otras proteínas de superficie de neumococo. Este es el caso de PspA, que presenta tres familias con 6 clados en total (Hollingshead *et al.*, 2000), o PspC, que presenta un alto grado de mosaicismo con hasta 11 combinaciones diferentes de segmentos proteicos (Iannelli *et al.*, 2002). La presencia de terminadores en las regiones 3' y 5' indica que el transcrito de ambas versiones del gen *diiA* es monocistrónico. Este resultado sugiere que DiiA no está implicada en la fisiología global celular (funciones metabólicas), como se ha descrito para otros factores de virulencia (Hava y Camilli, 2002).

Se ha detectado computacionalmente un dominio LPxTG en el extremo C-terminal de la proteína DiiA por el que esta se ancla a la pared celular. Otras proteínas que presentan este motivo de anclaje en *S. pneumoniae* son la neuraminidasa NanA (Camara *et al.*, 1994), la serín proteasa PrtA (Bethe *et al.*, 2001) y la hialorunidasa Hyl (Jedrzejewski, 2001). El resto de la proteína DiiA quedaría expuesto al exterior celular, lo que justifica que en estudios de ANTIGENoma se detectaran anticuerpos frente a esta proteína en sueros de pacientes sanos y convalecientes (Giefing *et al.*, 2008). En la sección expuesta se localiza el dominio DUF1542 con estructuras *coiled-coil*, también presentes en otras proteínas de neumococo como PspA (Yother y Briles, 1992). Al observar la presencia de dichas estructuras, se confirmó la capacidad de oligomerización de DiiA, lo cual permite a la proteína formar estructuras más complejas. La relevancia

de este hecho, al igual que lo observado en la proteína M1 en *S. pyogenes*, radica en que permitiría concentrar varios sitios de unión a una determinada molécula del hospedador, lo que incrementaría la capacidad de reconocimiento de ligandos de la proteína mediante un modelo de entrecruzamiento característico (Macheboeuf *et al.*, 2011). Otros rasgos típicos que confieren los dominios *coiled-coil* a las proteínas son la exposición y la flexibilidad (Phillips *et al.*, 1981), lo que favorece también el reconocimiento de ligandos en el hospedador. El dominio DUF1542 es exclusivo dentro de las proteínas tipo DiiA. En la región N-terminal de DiiA se localizan dos repeticiones (anotadas como dominios B_02864) constituidas por 37 residuos que comparten un 51% de identidad y para las que se predice una estructura de lámina- β . Estas repeticiones han sido designadas como R1 y R2, estando ambas presentes en la proteína codificada por el alelo largo y únicamente R2 en la proteína codificada por el alelo corto. La secuencia de estos motivos repetidos no se asemeja a la de otras repeticiones presentes en proteínas de superficie de neumococo como PspC (Brooks-Walter *et al.*, 1999) o PavB (Jedrzejewski, 2007).

Según recientes observaciones publicadas, las repeticiones de DiiA podrían pertenecer a una familia de motivos denominada MiiA (*Multiarchitecture invasion-involved motif A*) en el que las repeticiones suelen ir precedidas por regiones *coiled-coil* cortas, lo que sugiere la existencia de una unidad funcional superior a las repeticiones de MiiA. Esto podría dar lugar a una duplicación del motivo con el objetivo de conseguir un plegamiento tipo *sandwich* constituido por una doble lámina- β , similar al que se observa en las inmunoglobulinas (Martin-Galiano, 2017). Este tipo de plegamiento es recurrente en interacciones moleculares y se encuentra a menudo en adhesinas (Vengadesan y Narayana, 2011). Concretamente, algunas estructuras en láminas- β se han relacionado con el reconocimiento de carbohidratos asociado a virulencia, como el ácido siálico en receptores plaquetarios y del epitelio respiratorio.

La topología de DiiA (elemento de anclaje, tallo y región distal con repeticiones) es típica de adhesinas (Koretke *et al.*, 2006) como, por ejemplo, la proteína YadA de *Yersinia pestis*. YadA se ancla a la membrana mediante láminas- β , se proyecta al exterior gracias a estructuras *coiled-coil* - que además se unen a FH y C4BP - y en la región más expuesta posee pequeñas láminas- β agrupadas en forma de barril que se unen a colágeno (Mikula *et al.*, 2012). Para obtener información estructural adicional de DiiA, se trató de obtener la estructura de la proteína experimentalmente en colaboración con el grupo del Dr. Hermoso (Instituto Rocasolano de Físico-Química, CSIC) sin éxito.

Probablemente, fue la potencial flexibilidad de la región lo que impidió obtener cristales de alta calidad. En el futuro, sería conveniente intentar cristalizar DiiA en presencia de alguno de sus ligandos, de manera que se consiga una mayor estabilidad de la proteína (Hassell *et al.*, 2007).

Aunque DiiA solo tiene en común con las proteínas Rib de *S. agalactiae* y M de *S. pyogenes* el dominio de anclaje LPxTG, se ha descrito que estas dos proteínas presentan también repeticiones que aumentan el número de grupos de unión localmente por el ligando. Esto favorece la interacción con receptores al aumentar la afinidad, siendo la secuencia característica repetida en cada caso la que determine una función específica de la proteína (Dombek *et al.*, 1999; Baron *et al.*, 2004). Esta variación en las repeticiones no solo afecta a la función, sino también a la capacidad inmunogénica de las proteínas (Gravekamp *et al.*, 1997), por lo que el número final de repeticiones es la resultante del incremento en la afinidad, por un lado, y evitar una excesiva visibilidad por parte del sistema inmunitario del paciente, por otro. Por esta razón, el número de repeticiones de DiiA podría no haber sido superior a las dos presentes en el alelo largo. En el caso de proteínas similares a DiiA presentes en especies genéticamente más próximas a *S. pneumoniae*, como son *S. pseudopneumoniae* y *S. mitis*, las repeticiones muestran también un elevado grado de divergencia (< 50% de identidad). En el caso de *S. mitis*, la variabilidad en el número de repeticiones es también superior, pudiendo llegar a ser de hasta 10. Estas características indican que la generación de este tipo de proteínas se deben inicialmente a una transferencia horizontal de genes que posteriormente han experimentado procesos de recombinación y duplicación de diferentes secciones (Chothia *et al.*, 2003). Esta teoría se refuerza por el hecho de que módulos promiscuos de anclaje a pared, como el LPxTG (presente en DiiA), exponen secciones con repeticiones en tándem que tienden a recombinar entre ellas (Schneewind *et al.*, 1993). De este modo, las bacterias patógenas son capaces de generar nuevos factores de virulencia, que pueden ser conservados por presión selectiva, sin necesidad de sintetizarlos completamente *ab initio* (Rask *et al.*, 2010). *S. pneumoniae* es considerado un clon ancestral del complejo *S. mitis* que se ha adaptado progresivamente a la patogénesis, invasiva y no invasiva, por la adquisición de una serie de factores de virulencia (Donati *et al.*, 2010). Por tanto, el gen ancestral similar a *diiA* en el complejo *S. mitis* puede haberse escindido y transpuesto al espacio genómico delimitado por *tatD* y *rpmH* de *S. pneumoniae* al inicio de la formación de la rama evolutiva de neumococo seguido de eventos de recombinación y mutación hasta dar lugar al gen definitivo *diiA*.

Además, las diferencias entre DiiA y el resto de proteínas descritas indican que, aunque pudieran poseer actividades relacionadas, presumiblemente cada una presenta una función específica. Por todo ello, estas deberían de ser consideradas como familias que no comparten una relación de ortólogos con DiiA, de tal manera que esta última haya sido adquirida directamente, y no verticalmente por especiación, para ejercer funciones particulares en *S. pneumoniae*. El hecho de que *diiA* pertenezca al genoma núcleo (Hiller *et al.*, 2007) y la ausencia de homólogos en especies cercanas califican a este gen como un marcador inequívoco de *S. pneumoniae*.

Teniendo en cuenta que DiiA es un factor de virulencia específico de neumococo, la expresión de esta proteína podría estar regulada bajo unas circunstancias muy precisas (Hava *et al.*, 2003). Probablemente haya sido ésta la razón por la cual no se haya conseguido detectar diferencias en la expresión de DiiA entre el mutante y la cepa silvestre por *western blot* a pesar de probar distintos medios, fases de crecimiento, sueros y fracciones, como se ha descrito para proteínas de superficie de la especie *Streptococcus gordonii* (Davies *et al.*, 2009). En el caso concreto de DiiA tres antisueños diferentes fueron utilizados: uno de conejo obtenido a partir de péptido inmunogénico (producto de GenScript), otro de conejo a partir de la banda de extracción (producto de Davis biotechnologie), y uno de ratón a partir de proteína nativa purificada obtenido en nuestras instalaciones. Aunque todos los antisueños reconocieron la proteína recombinante purificada, no fue posible detectar DiiA en muestras biológicas más complejas. Las condiciones de crecimiento incluyeron tres medios semisintéticos diferentes: AGCH, Todd-Hewitt con extracto de levadura y Mueller-Hinton (con suero y sin suero bovino fetal). Las muestras fueron tomadas en fases de crecimiento exponencial: temprana ($DO_{620} = 0.2$) y tardía ($DO_{620} = 1.4$). Estas muestras incluían el extracto crudo, paredes celulares, fracción citoplasmática y fracción secretada. También se testó la adición de manganeso tras la cual se incrementaría la transcripción de *diiA* (Rosch *et al.*, 2009). A pesar de ello no se pudieron mimetizar *in vitro* las condiciones de expresión *in vivo*. Sin embargo, el número de lecturas obtenidas por RNA-Seq comenzando 70 pb por delante al codón de inicio propuesto es 4 veces más que la media de las lecturas obtenidas de zonas intragénicas en el genoma de neumococo (datos no mostrados). Esto indica que *diiA* puede ser traducido desde la posición propuesta a niveles moderados. Varios factores pueden dar lugar al hecho de que no fuera posible detectar DiiA en condiciones de laboratorio, entre ellos se encuentran la ausencia de un sitio consensuado para la unión al ribosoma, la utilización de un uso de codones

subóptimo (Mir *et al.*, 2012) y un estrecho control de la expresión bajo determinadas condiciones espaciotemporales durante la infección (Hava *et al.*, 2003).

La técnica de *western blot* no es la única utilizada para detectar la expresión de una proteína sobre la superficie celular. En nuestro caso empleamos la citometría de flujo con la que se han obtenido buenos resultados previamente para este fin. De hecho, la utilización de suero de ratón inmunizado con la versión larga de DiiA permitió detectar la presencia de DiiA en la superficie de la cepa silvestre, pero no de la cepa TIGR4 Δ diiA. Sin embargo, es importante matizar, que en el ensayo de citometría de flujo, de toda la suspensión bacteriana analizada, tan solo se detectó la proteína DiiA en un 23% de los neumococos silvestres, lo que confirma que la expresión de DiiA en condiciones *in vitro* es relativamente muy baja.

2. DiiA RECONOCE MOLÉCULAS DEL HOSPEDADOR QUE LA HACEN ESTAR IMPLICADA EN PROCESOS DE PATOGÉNESIS

Aunque en la literatura no se ha descrito la relación inequívoca entre la presencia de un tipo de alelo para un determinado gen y el tipo de infección que causa neumococo (Manso *et al.*, 2014), sería muy útil poder establecer este tipo de asociación para decidir el tipo de protocolo terapéutico que se le aplica al paciente. Las dos únicas variantes alélicas de *diiA* en cepas clínicas de *S. pneumoniae* podrían asociarse a fenotipos distintos de infección. De hecho las cepas clínicas que presentan la versión alélica larga se correlacionan con enfermedades neumocócicas invasivas como la bacteriemia y la neumonía bacteriémica. La OMS estima que ~1.6 millones de personas, incluidos 1 millón de niños menores de 5 años, mueren a causa de la ENI anualmente (WHO, 2007). Además, este tipo de enfermedades requieren de un tratamiento con antibióticos de amplio espectro hasta que los resultados de susceptibilidad antibiótica de la cepa estén disponibles, así como de medidas sanitarias de soporte (McCullers y Tuomanen, 2001). A pesar todo, la enfermedad neumocócica (particularmente la neumonía) puede ser difícil de confirmar microbiológicamente, por lo que sería necesario aunar esfuerzos encaminados al desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas de la ENI (Werno y Murdoch, 2008). En este sentido, la puesta a punto de la detección rápida del tipo de alelo de *diiA* de forma precisa, barata y sencilla por técnicas moleculares - y en combinación con otros genes -, podría ser beneficiosa como herramienta de control de dicha enfermedad, sobre todo considerando que *diiA* forma parte del genoma núcleo de esta especie (Hiller *et al.*, 2007) y que el dimorfismo alélico observado en genomas

secuenciados es un modelo genérico. Un abordaje de tipificación más amplio, que incluye el análisis de DiiA y otras proteínas de superficie, ha sido recientemente publicado con el objetivo de identificar clones virulentos emergentes (Domenech *et al.*, 2016). Este estudio se apoya en el hecho de que el comportamiento patogénico de neumococo no depende únicamente de un solo factor de virulencia, sino de una colección de los mismos.

La variación alélica de DiiA se correlacionó con el complejo clonal, el tipo de infección y el tipo de paciente. Todos los aislados clínicos pertenecientes a los complejos clonales altamente virulentos: CC306¹, CC19^{17F} y CC289⁵, los cuales causan ENI en pacientes sanos jóvenes (Grau *et al.*, 2012), presentan el alelo largo. Por el contrario, aislados de complejos clonales que carecen del alelo que codifica para la repetición R1, tienden a infectar a pacientes ancianos o personas con enfermedad de base como la EPOC (Sanchez *et al.*, 2011). Así, los datos epidemiológicos apuntan a una ventaja relativa en patogenicidad invasiva primaria para clones con alelo largo y un comportamiento virulento oportunista en aquellos con alelo corto de manera genérica. Sin embargo, el grado de contribución de los distintos alelos de DiiA a la invasividad por diferentes serotipos de neumococo aún debe evaluarse en trabajos futuros, ya que los aislados de serotipos que incluyen varios complejos clonales, en especial los serotipos 3, 19A y 19F, presentan una mayor variabilidad alélica. Este hecho, en el serotipo 3, podría explicarse teniendo en cuenta que el grosor de la cápsula podría ocultar la exposición de factores de virulencia localizados en la superficie (Muñoz-Almagro *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2011). Por su parte, los serotipos 19A y 19F presentan una cápsula con gran capacidad adaptativa a distintos secuencitipos (Elberse *et al.*, 2011; van der Linden *et al.*, 2013).

Mediante la utilización de mutantes, se ha confirmado causalmente que DiiA es un factor de virulencia neumocócico en modelo murino, al igual que se ha demostrado con otras proteínas de neumococo como LytA (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015), PiuA/PiaA (Brown y Gilliland, 2001) o familia de proteínas Pht (Ogunniyi *et al.*, 2009). Sin embargo, la variabilidad de cepas utilizadas, así como los modelos de ratones y la manera de expresar los resultados es variable, lo que dificulta la comparación.

Históricamente, la contribución de un determinado gen en virulencia se ha estudiado *in vivo* determinando la DL₅₀. Esta medida se define como el número de bacterias necesarias para matar al 50% de los animales infectados. Los resultados con DL₅₀ son útiles en ensayos de virulencia, pero presentan ciertas limitaciones, ya que aportan un

dato relativamente crudo y solo reflejan el efecto acumulativo de los distintos procesos implicados en la muerte del animal. El hecho de que un mutante no alcance la DL_{50} no implica necesariamente que el gen que presenta la mutación sea determinante en la virulencia, sino que puede reflejar una situación en la cual el efecto no fue suficiente para detectarse en el ensayo. El IC es una medida alternativa que utiliza infecciones mixtas para determinar el grado de atenuación en virulencia causado por una determinada mutación. Esta medida es más sensible que la DL_{50} porque refleja directamente el número de bacterias en vez de la supervivencia del animal hospedador y, por ello, se puede distinguir entre cepas mutantes cuya atenuación en virulencia es demasiado sutil para ser detectada mediante DL_{50} . Además, el análisis de los niveles de virulencia de mutantes frente a la cepa silvestre en el mismo animal, como ocurre en los ensayos de IC, disminuye las variaciones que pueden ocurrir entre distintos individuos. La DL_{50} se calcula a partir del número discreto de animales que sobreviven a la infección, mientras que el IC se obtiene a partir de la relación entre el número de bacterias antes y después de la infección, por lo que se obtiene una cifra con un tamaño muestral superior, al ser una variable continua. El IC constituye, por tanto, un indicador de la atenuación en virulencia usando menos animales lo que también refuerza bioéticamente la utilización de este abordaje. Una consideración que hay que tener en cuenta cuando se quiere aplicar el IC es el hecho de que se conviene incluir como control un mutante con el gen completo, en nuestro caso TIGR4-R1R2. El IC es también un método versátil donde la ruta de infección, la dosis, el ratio de infección y el tiempo/lugar de obtención de muestras puede ser modificado para obtener una descripción más detallada de la contribución en virulencia de un determinado gen. Todos estos factores han hecho que el análisis del IC haya incrementado su aceptación por la comunidad científica como método para determinar el grado de atenuación en virulencia (Neef *et al.*, 2011; Trihn *et al.*, 2013; Czechowska *et al.*, 2014; Sabag-Daigle *et al.*, 2016).

En los ensayos de patogénesis, el mutante TIGR4-R1R2 tiene importancia porque representa la restauración funcional del mutante completo, mientras que el resto de mutantes de delección, así como el mutante completo, han permitido estudiar la relevancia de cada uno de los dominios de DiiA. Una de las características más importantes a la hora de seleccionar TIGR4 en nuestro estudio fue su capacidad para causar infección en ratones con un tamaño de inóculo y en un tiempo adecuado para los experimentos de este tipo (Aaberge *et al.*, 1995), ya que no todas las cepas poseen esta

característica debido a que el ratón no es un hospedador natural de *S. pneumoniae* (Gingles *et al.*, 2001). La estirpe de ratón seleccionada para los ensayos de virulencia fue C57BL/6 ya que es una cepa cosanguínea, es decir, con genoma prácticamente idéntico, lo que facilita la reproducibilidad e interpretación de los resultados experimentales. Además, a partir de esta estirpe se pueden obtener mutantes en determinados genes, lo que sería beneficioso a la hora de estudiar los ligandos/receptores de DiiA en el hospedador en futuros estudios. Por último, cabe destacar que esta estirpe es la idónea para llevar a cabo modelos de colonización (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011), probablemente porque las células que conforman el epitelio de la nasofaringe del animal son las que más se asemejan a las células nasofaríngeas humanas. Un hándicap de estos ratones es que el modelo de neumonía invasiva es arduo de reproducir debido a la resistencia intrínseca de estos animales a este tipo de infección. De hecho, fue necesaria una carga bacteriana intranasal muy elevada (5×10^7 UFC/ratón) para conseguir recuperar bacterias de la sangre. Este dato se corresponde con los resultados obtenidos por el grupo de McPheat, donde tras la administración IN de 10^6 UFC de la cepa D39 de *S. pneumoniae*, sobrevivieron casi la mitad de los ratones C57BL/6.

El análisis de diversas muestras de ratones infectados por distintas vías permitió mimetizar y monitorizar con rigor el proceso completo de infección neumocócica y la implicación de las distintas secciones de DiiA en el mismo. De este modo, se logró determinar que DiiA está involucrada en la colonización de la nasofaringe por neumococo gracias a la presencia de las dos repeticiones, ya que en muestras de lavado nasofaríngeo los mutantes carentes de repeticiones presentaron índices de competitividad significativamente menores a la unidad. Este resultado podría justificar el hecho de que en el gen *diiA* de todos los aislados clínicos analizados se encuentre presente por lo menos la repetición R2. DiiA contribuiría así a la colonización junto a otras actividades desarrolladas por otras proteínas como es la actividad sialidasa por NanA (King *et al.*, 2006), la actividad lítica de la proteasa IgA1 (Kilian *et al.*, 1979) o la actividad conectora de PspC (Hammerschmidt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000).

Los ensayos de virulencia en modelos murinos muestran también que DiiA actúa en distintos estadios durante la ENI gracias a las repeticiones. Por una parte, afecta a la replicación en el tracto respiratorio inferior, Además, participa en la internalización a través del pulmón. Otro aspecto importante es que media durante la diseminación a sangre. En general, los valores de IC de LBA, pulmón y sangre para los mutantes sin

repeticiones se mueven en un rango de 0.5-4.5 logaritmos de diferencia respecto de la cepa TIGR4. Concretamente, se observa una diferencia más acentuada entre los mutantes DiiA-R1R2 y TIGR4-R2 en la muestra de pulmón y de sangre, lo que apunta a que la repetición R2 es necesaria para llegar a producir neumonía no invasiva. Estos resultados sugieren, por tanto, que R2 coopera con R1 para el establecimiento del proceso de neumonía, lo que se sumaría a la explicación de por qué el gen *diiA* de todos los aislados clínicos de neumococo contiene al menos la repetición R2. Como se ha comentado anteriormente, la NanA de neumococo escinde el ácido siálico, lo que hace que queden expuestos carbohidratos como *N*-acetilgalactosamina(β 1-3)galactosa que sirven de anclaje a la bacteria (Andersson *et al.*, 1983). La acción de la neuraminidasa podría, por tanto, dejar expuestos ligandos que fueran reconocidos por las repeticiones R1 y R2 de DiiA. Este sería un punto interesante a estudiar en futuras investigaciones. Recientemente se ha sugerido que las estructuras en lámina- β , incluidas en MiiA, cooperarían potencialmente en el reconocimiento de carbohidratos para mediar la virulencia (Martin-Galiano, 2017). A este respecto, una técnica que sería conveniente utilizar es la de *microarrays* de glúcidos, ya que ha sido utilizada con éxito en análisis glicómicos de lectinas (Gao *et al.*, 2012).

Por otro lado, hay que destacar que en la muestra de sangre también existen diferencias entre el mutante con una y con dos repeticiones (> 1 logaritmo), por lo que la repetición R1 puede jugar un papel crucial en el paso a ENI, lo cual se ajusta a los resultados epidemiológicos que indican que el alelo largo con dos repeticiones se asocia significativamente a este tipo de enfermedad. Se confirma así que el alelo largo es una versión patoadaptativa del gen que potencia la internalización a través del tracto respiratorio y consecuentemente la virulencia primaria invasiva. Por lo tanto, podemos concluir que las dos versiones de DiiA, con una o dos repeticiones, parecen ser suficientes para favorecer ambos paradigmas infecciosos, ENI y ENNI. El gen *diiA* muestra, por tanto, rasgos que apoyan la contribución al proceso de especiación de *S. pneumoniae* hacia una bacteria con un alto potencial invasivo debido a la capacidad para penetrar dentro del epitelio pulmonar. Este aspecto bimodal exclusivo puede ser causado por la divergencia de secuencias entre repeticiones que comparten un 51% de identidad entre residuos, lo cual puede impedir una recombinación interna posterior, como se observa con las repeticiones SSUSE, esencialmente idénticas, de PavB (Jedrzejewski, 2007).

Por último, el papel de DiiA en la persistencia de neumococo en el torrente circulatorio se evaluó inoculando la bacteria en el peritoneo, a partir del cual llega directamente a sangre utilizando una dosis letal previamente evaluada (Yuste *et al.*, 2002). El mutante de delección total, TIGR4 Δ diiA, sufre una caída drástica del IC, superior a 5 unidades de magnitud, respecto a la cepa silvestre. Esto indica la relevancia del fragmento con regiones *coiled-coil* de DiiA en la persistencia de la bacteria en el suero donde se localizan componentes importantes para la inmunidad innata y adaptativa, como puedan ser los componentes del sistema de complemento que median la fagocitosis de *S. pneumoniae*. Esto permite afirmar que la sección de DiiA comprendida entre R2 y el dominio de anclaje tiene un papel fundamental en la supervivencia bacteriana en sangre durante el proceso de sepsis neumocócica, ya que evita una eliminación rápida de la misma de la circulación sanguínea. Además, en sangre se produce un cambio de fase por el que la bacteria aumenta el grosor de la cápsula quedando así menos expuestas las proteínas de superficie y las adhesinas (Weiser *et al.*, 1994; Kim y Weiser, 1998). Esto hace que se inhiba el depósito sobre la bacteria de elementos del complemento, CRP, proteínas de unión a manosa y anticuerpos, todo ello en último término favoreciendo la evasión de la fagocitosis (Hyams *et al.*, 2010).

Conocer los ligandos de las distintas proteínas de neumococo en el hospedador puede ayudar a caracterizar la función de dichas proteínas como se ha comentado anteriormente. Con este objetivo se utilizó inicialmente la técnica de ELISA. Sin embargo, los valores de DO₄₅₀ obtenidos fueron muy bajos (<0.2). Probablemente esto se debiera a la utilización de anticuerpos secundarios poco específicos. Una técnica utilizada para la investigación de este tipo de interacciones moleculares en el campo de la enfermedad neumocócica es la SPR (Voss *et al.*, 2013). Esta técnica es ventajosa porque no requiere de un marcaje secundario y monitoriza las interacciones moleculares en tiempo real. La detección de unión sin la utilización de un marcador fluorescente o radioactivo, evita el paso de marcaje que además de reducir tiempo y dinero, puede alterar las interacciones moleculares dependiendo de la naturaleza de la diana. Una de las consideraciones que hay que tener en cuenta a la hora de utilizar esta técnica es la formación de artefactos durante el paso de inmovilización, sin embargo, un correcto diseño del experimento puede prevenir esta limitación. Los estudios llevados a cabo mediante SPR para determinar los ligandos de DiiA muestran que tanto colágeno como hLf son capaces de unirse al tallo de DiiA con una K_D de rango nanomolar. La unión a

estas proteínas del hospedador por parte de neumococo ya ha sido descrita antes ya que RrgA (Hilleringmann *et al.*, 2008) y NanA (Frolet *et al.*, 2010) se unen también a colágeno. La repercusión que tiene la unión de proteínas neumocócicas a colágeno no se ha descrito en detalle aunque RrgA sí potencia la adhesión (Nelson *et al.*, 2007) probablemente al ser el colágeno una de las proteínas que constituye la matriz extracelular. De hecho, sería necesario realizar ensayos más específicos al respecto para determinar en profundidad la implicación de DiiA en la unión a dicha molécula. La capacidad de *S. pneumoniae* de reconocer específicamente hLf ya se había descrito previamente, siendo PspA uno de los dos componentes de la pared implicados en esta actividad (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Si bien es cierto que las bacterias patógenas desarrollan mecanismos para adquirir el escaso hierro libre presente en los tejidos mediante sideróforos, también se ha descrito la capacidad de obtener este elemento a partir de proteínas que presentan grupo hemo (hemina y hemoglobina), pero no de proteínas transportadoras de hierro (lactoferrina y transferrina) (Tai *et al.*, 1993). Además, se ha estudiado que la aLf presenta péptidos que tienen actividad bactericida (Shaper *et al.*, 2004; Mirza *et al.*, 2011), un hecho que no es concluyente respecto a hLf.

La falta de conocimiento en relación a la función de la hLf, así como a la implicación que se ha descrito para la Lf en la activación del complemento (Rainard, 1993), hizo que se planteara un análisis sobre la relevancia de aLf y hLf en el depósito de C3b. Si bien no se observó actividad a este nivel para la aLf, probablemente porque su actividad antibacteriana sigue otro mecanismo como se ha descrito previamente, la incubación con hLf en presencia de DiiA sí que redujo la acumulación de C3b en la bacteria. La hLf podría mediar entonces en el depósito de C3b sobre la bacteria, mientras que DiiA sería capaz de secuestrar hLf para evitar la acumulación de este componente clave del sistema inmunitario en la superficie bacteriana. De este modo DiiA podría contribuir a la evasión de la fagocitosis en el torrente circulatorio, sobre todo teniendo en cuenta que el fragmento NR es el que une hLf y el que en modelos animales ha mostrado una implicación relevante en la supervivencia de la bacteria en sangre. Si bien es cierto que, sería necesario realizar experimentos complementarios en un futuro para confirmar estas hipótesis.

El hecho de que en modelos animales las repeticiones de DiiA estén relacionadas con procesos de internalización a nivel de pulmón nos hizo desarrollar ensayos para ratificar la idea de que DiiA interacciona directamente con células epiteliales pulmonares.

Utilizando una metodología ya estandarizada, se observó que la presencia de DiiA disminuye la capacidad de neumococo para interactuar con las células del epitelio pulmonar. Este resultado es cuanto menos sorprendente, ya que resulta intuitivo establecer una asociación entre capacidad invasiva y adhesión. Esta menor interacción podría dificultar el reconocimiento de la bacteria por células del epitelio respiratorio, de manera que no se iniciara la respuesta inmunitaria correspondiente. Nuestros datos se encuentran en concordancia con trabajos previos que muestran que aislados persistentes de *H. influenzae* no tipificable en pacientes EPOC presentan una menor capacidad de adhesión a células pulmonares, en comparación con cepas de nueva adquisición o infección, además, los primeros aislados inducen también la secreción de niveles más bajos de IL-8 (Chin *et al.*, 2005; Garmendia *et al.*, 2014). Por consiguiente, el hecho de que las células del tracto respiratorio tardan en reconocer a la bacteria patógena, le puede conferir una ventaja al microorganismo, ya que cuanto más se retrase el inicio de la respuesta inflamatoria mediada por la activación de estas células, más opciones tendrá la bacteria para multiplicarse y diseminarse.

Teniendo en cuenta que la Lf se encuentra presente en secreciones mucosas como las pulmonares y que DiiA no favorece directamente la unión a células del epitelio pulmonar, nos planteamos si la combinación de estas dos proteínas regularía de algún modo la interacción entre neumococo y el pulmón. Sin embargo, no se observó repercusión a este respecto ni con aLf ni con hLf. Este hecho puede ser debido a que las A549 (células del epitelio pulmonar) utilizadas no son las más adecuadas ya que no presentan receptores para la Lf, como es el caso de las células bronquiales BEAS-2B que sí los presentan (Ghio *et al.*, 1999). Por tanto, en próximos experimentos sería conveniente utilizar esta última línea celular y evaluar si la Lf está implicada en la adhesión de neumococo al epitelio pulmonar y así poder caracterizar la contribución de DiiA y PspA en este proceso.

La plurifuncionalidad observada en DiiA es común en proteínas de superficie politópicas presentes en organismos patógenos. Estas proteínas contienen varios módulos que se disponen como cuentas de un rosario ejerciendo actividades relativamente independientes unas de otras, aunque sumatorias (Martin-Galiano, 2017). Estas funciones están generalmente relacionadas con la interacción con moléculas del hospedador (Mikula *et al.*, 2012). A este respecto, PspA reduce la cantidad de C3b depositada sobre la bacteria y, por lo tanto, la eliminación de la bacteria por la vía clásica del complemento (Tu *et al.*, 1999), pero también capta aLf para evitar el efecto

bactericida de las misma (Shaper *et al.*, 2004). Por su parte, PspC también contribuye al desarrollo de sepsis (Iannelli *et al.*, 2004), pero en este caso reclutando FH (Hyams *et al.*, 2013) y el componente C4BP (Dieudonne-Vatran *et al.*, 2009), mientras que su actividad en colonización esta mediada por el reconocimiento del receptor polimérico de Ig (Zhang *et al.*, 2000). En este sentido, la neumolisina activa la vía clásica del complemento causando el consumo inapropiado de proteínas del complemento (Paton *et al.*, 1984; Yuste *et al.*, 2005), aunque también permite la invasión de neumococo mediante la formación de poros en la membrana de células del hospedador (Marriott *et al.*, 2008). Además, se ha descrito la actividad pleiotrópica de LytA a nivel del sistema del complemento, ya que no solo inhibe la vía clásica, reclutando C4BP y evitando el depósito de C1q y CRP, sino también la vía alternativa, reclutando FH (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015).

Con toda esta información queda patente que DiiA es una proteína inmunogénica (Giefing *et al.*, 2008), dimórfica, específica de neumococo, con funciones diversas a nivel de interacción con el hospedador, al igual que las proteínas descritas anteriormente, e implicada en patogénesis y, por lo tanto, su potencial en vacunación debía ser evaluado como posible proteína candidata en una necesaria vacuna serotipo-independiente (Moffitt y Malley, 2011).

3. DiiA COMO POTENCIAL ANTÍGENO VACUNAL

A pesar del uso de vacunas frente a la infección por *S. pneumoniae*, la enfermedad neumocócica sigue teniendo graves consecuencias a nivel social y económico (Daniels *et al.*, 2016). Las limitaciones de estas vacunas basadas en polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* (conjugados o no) han incrementado el interés en la búsqueda de nuevos candidatos. Gracias a los avances de la era postgenómica, la detección de algunos de estos candidatos, ignorados hasta la fecha por limitaciones técnicas, ha podido llevarse a cabo siguiendo la metodología de la vacunología reversa (Rappuoli, 2001). Este ha sido el caso de la proteína DiiA de neumococo, cuya expresión se detecta de forma poco eficiente en condiciones *in vitro*. Sin embargo, gracias a herramientas bioinformáticas se ha podido determinar que esta proteína presenta un elevado potencial como antígeno vacunal frente a neumococo al ser exclusiva de esta bacteria, estar codificada por el genoma núcleo de la especie, presentar un dominio de anclaje a pared y poseer baja variabilidad alélica. Si estos datos los complementamos con el hecho de que esta proteína está implicada en la patogénesis de la bacteria en distintos estadios de la

infección, parece lógico llevar a cabo un estudio más en detalle de la posible actividad inmunoprotectora de la misma. Aunque la inmunogenicidad de esta proteína en humanos ya se había apuntado gracias a un análisis de alto rendimiento, ANTIGENoma (Giefing *et al.*, 2008), en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un estudio por predicciones epítipo/inmunogenicidad usando un consenso de herramientas bioinformáticas. La baja identidad ($\leq 50\%$) compartida entre las repeticiones de DiiA y proteínas de cualquier otra especie así como las predicciones epítipo/inmunogenicidad apuntan a una posible estimulación del SI frente a neumococo sin alterar la microbiota de los individuos vacunados.

La inmunogenicidad de dos secciones de DiiA se confirmó experimentalmente de un modo preciso utilizando modelos murinos. Las pautas de inmunización en la literatura son muy variadas, tanto en número de dosis, como en cantidad de antígeno utilizado y tipo de adyuvante (Akhmatova *et al.*, 2016; Jang *et al.*, 2017; Tostes *et al.*, 2017). La pauta de esta tesis se basó en el protocolo preestablecido por Paton como experto reconocido a nivel mundial en ensayos de vacunación y readaptada con éxito (Corsini *et al.*, 2016). La estirpe de ratón seleccionada para los ensayos de inmunización fue BALB/c, por las propiedades de reproducibilidad descritas anteriormente, además de que presentan un SI más potente que el resto de las estirpes (Gingles *et al.*, 2001) que responde activamente frente a polisacáridos capsulares (Perlmutter *et al.*, 1978). Otra razón por la que se ha seleccionado esta estirpe de ratón, es porque permite estudiar adecuadamente la respuesta de inmunoglobulinas frente a un antígeno y, por tanto, la capacidad de inmunización, además, estos ratones son más resistentes a la infección por neumococo (Gingles *et al.*, 2001; Kadioglu y Andrew, 2005; Chiavolini *et al.*, 2008) lo que permite un seguimiento más largo del proceso infectivo y se puedan estudiar las diferencias de protección en vacunación en distintos escenarios. La estirpe C57BL/6 se utilizó solo en los estudios de inmunización IN, ya que fue en esta estirpe en la que se logró obtener una colonización estable de la cepa de neumococo TIGR4 silvestre a lo largo de una semana de seguimiento (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011).

La inmunización IP de DiiA promueve una respuesta inmunológica sistémica que cursa con la producción de varios tipos de IgGs. En concreto, la producción de subtipos de IgG2 e IgG3 relacionadas con la activación del complemento (Goding, 1993) y el reconocimiento de carbohidratos (Perlmutter *et al.*, 1978) en ratones, respectivamente. En humanos estas actividades las desempeñan las inmunoglobulinas de tipo IgG1/IgG3 (Soininen *et al.*, 1999) e IgG2 (Barrett *et al.*, 1986), respectivamente. Las repeticiones

de DiiA por su estructura secundaria en lámina- β son potencialmente capaces de reconocer y transportar carbohidratos (Martin-Galiano, 2017), los cuales inducirían la producción de IgG3 en ratón. De este modo las repeticiones ejercerían un efecto modulador adicional similar al de algunos adyuvantes (Freund, 1956). Este hecho apoya la teoría comentada anteriormente acerca de la implicación de las repeticiones en el reconocimiento de receptores glucídicos. El efecto inmunomodulador de las repeticiones constituyentes de proteínas de superficie, ya ha sido descrito previamente por otro grupo, pero sin llegar a dilucidar el mecanismo por el cual esto ocurre (Stalhammar-Carlemalm *et al.*, 2007). Aunque en algún caso sí que se ha rechazado la idea de que las repeticiones aumentan *per se* la afinidad (Papasergi *et al.*, 2013), lo que sí se ha descrito es que la delección de repeticiones, concretamente en la proteína α C de estreptococos del grupo B, potencia la patogenicidad de la bacteria en ratones inmunizados con la versión de la proteína que contiene más repeticiones (Gravekamp *et al.*, 1998). En este estudio concluyeron que las causas son: (1) la pérdida de epítomos conformacionales protéicos y (2) la pérdida de unión de los anticuerpos a la proteína debido a una disminución del tamaño del antígeno en relación a componentes de la pared y/o a la cápsula. Se retoma así la idea de la importancia del número de repeticiones en las proteínas para las bacterias, de manera que consigan un equilibrio entre su actividad y la capacidad de evadir al sistema inmunitario.

La elección del adyuvante Alhydrogel[®] fue debida a que está aprobada su utilización en seres humanos como puede confirmarse por algunos estudios en los que se ha evaluado la respuesta inmunológica de determinadas proteínas neumocócicas candidatas a vacuna en humanos (Bologa *et al.*, 2012; Kamtchoua *et al.*, 2013). Las sales de aluminio utilizadas como adyuvantes, convierten los antígenos solubles en partículas con un diámetro inferior a 10 μ m, que son captadas por las células presentadoras de antígeno. Además, las sales de aluminio presentan efectos múltiples a nivel de la RI. En este sentido, activan el complemento, estimulan los L_B, CD4 y CD8, activan la respuesta de macrófagos, regulan las señales de coestimulación en monocitos y promueven la liberación de IL-4. Otro aspecto importante a destacar se basa en que la administración de sales de aluminio, al inducir inflamación en el sitio de inyección, atrae células presentadoras de antígeno y potencia de esta forma la RI. Como contrapartida, habría que tener en cuenta que las sales de aluminio no estimulan las respuestas Th1 que media la secreción de IFN- γ , ni la producción de IgG2 por los linfocitos B. En cambio estimula la respuesta Th2, la secreción de IL-5 y la producción

de IgG1 e IgE (Marrack *et al.*, 2009; Coffman *et al.*, 2010; Reed *et al.*, 2013). Por todo ello, las reacciones adversas más frecuentemente relacionadas con el uso de sales de aluminio como adyuvantes son las reacciones locales de tipo eritema y formación de granulomas y nódulos subcutáneos.

La falta de repuesta celular observada tras inmunización IP puede deberse a que los linajes estudiados no eran los más adecuados, ya que se ha descrito que la respuesta celular específica en humanos frente a neumococo es mediada por Th1 y Th17 (Olliver *et al.*, 2011). Además, el adyuvante seleccionado en nuestro estudio raramente induce respuesta mediada por linfocitos Th1, sin embargo fue seleccionado porque es ampliamente utilizado para uso en humanos (Mohan *et al.*, 2013).

DiiA confiere inmunoprotección en ratón de manera dependiente de concentración, frente a la sepsis neumocócica producida por cepas que presentan el alelo correlacionado con ENI. La carga bacteriana en sangre de ratones vacunados con DiiA disminuyó respecto a los ratones del grupo control tratados solo con el adyuvante, los cuales fallecieron sin excepción. La protección con la versión de DiiA que incluye las dos repeticiones es similar a la obtenida con PcpA (Glover *et al.*, 2008) y subunidades de pilus (Gianfaldoni *et al.*, 2007) frente a la misma cepa de neumococo. La protección fue significativamente más débil cuando se llevó a cabo la inmunización con el fragmento DiiA-NR. Estos resultados concuerdan con el hecho de que mientras que los mutantes sin repeticiones presentaron una atenuación en ensayos de virulencia por sepsis IP (IC $\sim 10^{-3}$), el mutante completo fue prácticamente incapaz de sobrevivir (IC $< 10^{-6}$). La proteína DiiA no fue eficaz en la prevención de la neumonía bacteriémica tras inmunización IP, probablemente porque los niveles de inmunoglobulinas a nivel de pulmón tras la inmunización IP no sean suficientes como se ha descrito en otros casos (Moreno-Fierros *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003). Para alcanzar niveles adecuados y protectores de anticuerpos a nivel pulmonar sería conveniente utilizar un adyuvante diferente como puede ser el CpG oligodesoxinucleótido por vía intramuscular (EL-Malky *et al.*, 2014). Si bien es cierto que la inmunización con otras proteínas como LytB consiguen niveles significativos de protección frente a la neumonía bacteriémica utilizando como adyuvante el hidróxido de aluminio, no se probó su protección frente al aislado TIGR4 que contiene las dos repeticiones (Corsini *et al.*, 2016). Además, sería conveniente tener en cuenta que puede ser que DiiA no sea tan necesaria en el ambiente pulmonar donde otras proteínas de superficie descritas anteriormente pueden operar como mediadores de adhesión bacteriana. La proteína es importante en colonización y

sepsis, mientras que el efecto en pulmón puede extenderse como una forma de disminuir la colonización. Una posible explicación podría ser que las repeticiones pueden reconocer receptores en el epitelio respiratorio superior y en células sanguíneas, mientras que la sección DiiA-NR contribuye a la unión de colágeno y hololactoferrina. Por ello, la ausencia de repeticiones en el antígeno proteico disminuye consecuentemente la inmunogenicidad y la protección en sepsis.

En el caso del serotipo 3, la actividad de los anticuerpos pudo verse limitada principalmente por dos factores. Por un lado, debido al marcado grosor de la cápsula de este serotipo (Weinberger *et al.*, 2010; Grabenstein *et al.*, 2014), los anticuerpos anti-DiiA no serían capaces de alcanzar a la proteína. Otra posibilidad que explicaría la pobre respuesta, tanto de DiiA como de las actuales vacunas, frente al serotipo 3 es porque se ha descrito que los aislados de este serotipo liberan fragmentos de cápsula al exterior a los que podrían ir unidos tanto opsoninas del complemento y anticuerpos específicos frente a la proteína en cuestión (Choi, 2016).

Se ha demostrado también que DiiA es capaz de producir una respuesta de inmunoglobulinas específicas a nivel de mucosas. Según la literatura (Goding, 1993), los niveles de IgA son superiores a los de IgG cuando la proteína se administra por vía IN, debido al lugar de obtención de la muestra. Además, nuestros datos también indican que DiiA puede contribuir a disminuir el estado de portador reduciendo o erradicando la carga bacteriana en la nasofaringe. Aunque el uso de vacunas para disminuir el estado de portador se ha descrito, este hecho no está exento de debate por sus posibles repercusiones en cuanto al resto de la microbiota (McDaniel y Swiatlo, 2016), ya que no hay estudios concluyentes al respecto hasta la fecha. Lo que sí está demostrado es que la inmunodepresión es un factor de riesgo para el desarrollo de la infección neumocócica (Feldman y Anderson, 2014). Teniendo en cuenta que la colonización nasofaríngea es un prerrequisito para la infección neumocócica (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013), una vacuna encaminada a atenuar el estado de portador podría ser muy beneficiosa en determinadas circunstancias, por ejemplo, la inmunización previa a tratamientos inmunodepresores. En este sentido cabe destacar la disminución de infecciones protésicas durante la cirugía en pacientes tratados profilácticamente con mupirocina tópica con el objetivo de disminuir la colonización por *Staphylococcus aureus* (Malcolm *et al.*, 2016).

La vacunación de ratones BALB/c con la proteína DiiA, en presencia de hidróxido de aluminio por vía parenteral, indujo una fuerte respuesta de inmunoglobulinas de

diferentes subclases incluyendo IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA. Esta respuesta generada tras la inmunización con DiiA es de gran interés desde el punto de vista inmunológico ya que muchas de estas subclases son producidas por las actuales vacunas antineumocócicas como la VPS23V y las VCs (Rosado *et al.*, 2013). En este sentido, cabe destacar que la respuesta de anticuerpos conferida por la vacuna PVS23V es predominantemente de la subclase IgG2 (Lottenbach *et al.*, 1999; Uddin *et al.*, 2006). La magnitud de la respuesta de inmunoglobulinas proporcionada por las VCs varía según el serotipo, la formulación de la vacuna y la edad (Kamboj *et al.*, 2003). En adultos, las VCs inducen principalmente una respuesta de tipo IgG2, mientras que en los niños, la respuesta predominante es de subclase IgG1 (Lottenbach *et al.*, 1999). Los resultados de esta Tesis Doctoral confirman que la inmunización con DiiA resultó exitosa como proteína candidata a vacuna y que los resultados obtenidos en ratón podrían extrapolarse a la población humana. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen diferentes subclases IgGs entre humanos y ratones. De hecho, es difícil correlacionar de un modo claro, la funcionalidad de determinados subtipos de IgG entre las diferentes especies ya que no son directamente equivalentes (Mestas y Hughes, 2004). A pesar de la dificultad que supone comparar los hallazgos derivados de modelos murinos en cuanto a respuesta de IgG, con los obtenidos en humanos, este tipo de estudios realizados en animales puede ser de gran utilidad a la hora de caracterizar nuevos antígenos proteicos para el desarrollo de vacunas, ya que permite incrementar nuestro conocimiento de los mecanismos inmunológicos de protección frente a *S. pneumoniae*.

También es importante recordar que cuando se inmunizó con la proteína DiiA, tanto por vía IN como IP, se observó reactividad cruzada, de modo que los anticuerpos frente a DiiA-R1R2 también eran capaces de reconocer la proteína truncada DiiA-R2. Estos resultados confirman que la inmunización con el fragmento que contiene las dos repeticiones es capaz de reconocer las dos versiones alélicas de DiiA, pudiendo prevenir así la capacidad de *S. pneumoniae* de producir no solo enfermedades invasivas, sino también no invasivas así como el proceso de colonización. El hecho de la reactividad cruzada entre distintos fragmentos de proteína y proteínas con distinta variabilidad alélica también se ha descrito para otras proteínas de neumococo (Moreno *et al.*, 2010; Plumptre *et al.*, 2013) y supone una enorme ventaja ya que con un único antígeno se podrían obtener protección frente a distintas cepas independientemente de su serotipo.

En el caso de proteínas muy inmunogénicas, como PspA (Kono *et al.*, 2011) y PspC (Ricci *et al.*, 2011), son capaces de inducir una fuerte respuesta, pero muestran una importante variabilidad alélica (Hollingshead *et al.*, 2000; Iannelli *et al.*, 2002) lo que dificulta su uso como antígenos vacunales. Este efecto puede equilibrarse combinando en una única formulación vacunal proteínas multialélicas altamente inmunogénicas con otras proteínas de inmunogenicidad media que presenten menor variabilidad entre diferentes aislados clínicos, como podría ser el caso de DiiA. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se describe que la protección natural adquirida frente a la ENI, depende mayoritariamente de anticuerpos producidos frente a proteínas de superficie (Wilson *et al.*, 2017) y no frente a la cápsula como se pensaba hasta la fecha (Hussain *et al.*, 2005). Esto inclina la balanza aún más hacia la producción de vacunas proteicas. Un aspecto a destacar es la importante contribución que supondría la inclusión de DiiA en una vacuna universal, ya que es codificada por el genoma núcleo y los datos epidemiológicos indican que aproximadamente el 60% de los casos clínicos presentan el alelo largo (Domenech *et al.*, 2016). En conjunto, si se utilizara una única proteína con fines profilácticos, debido a la limitada reactividad cruzada entre variantes proteicas y su posible expresión en diferentes fases del proceso infeccioso que podría afectar a diversas funciones, podría permitir a la bacteria evadir la inmunoprotección causando infección. Esto indica que combinaciones de proteínas, en lugar de una proteína única, es la estrategia más óptima para proteger en el futuro a la población de riesgo. En contraste a la mayoría de las proteínas de neumococo analizadas en la literatura, DiiA no es una proteína clásica desde el punto de vista inmunogénico, pero su caracterización reciente como tal requiere de atención, debido tanto a sus propiedades, teóricas y experimentales al igual que su posible actividad como antígeno vacunal. El uso de vacunología reversa puede revelar la identificación de candidatos prometedores que puedan estar anotados hasta la fecha solo como proteínas hipotéticas o proteínas de superficie no caracterizadas para proteger frente a neumococo, en lugar de centrarse exclusivamente en esfuerzos sobre proteínas tradicionales. Debido a que estos nuevos candidatos enriquecerían la actividad de una combinación vacunal, y en base a los resultados obtenidos en esta tesis, se sugiere la inclusión de DiiA en futuras formulaciones antineumocócicas.

VI. CONCLUSIONES

1. DiiA (*Dimorphic invasive-involved protein A*) es una proteína de superficie de *S. pneumoniae*, no caracterizada hasta la fecha, que presenta una arquitectura típica de adhesina. Está constituida por un dominio de anclaje a pared tipo LPxTG, un tallo con capacidad de interacción con el hospedador y una sección distal que presenta una o dos repeticiones de un motivo de 37 residuos.
2. El gen que codifica la proteína DiiA es específico de *S. pneumoniae* y forma parte del genoma núcleo de este microorganismo. Este gen puede presentar dos alelos, uno corto y otro largo, que se corresponden con la versión de DiiA con una y dos repeticiones, respectivamente.
3. El tipo de alelo de DiiA es un determinante epidemiológico a nivel clonal. El alelo largo se asocia con clones de *S. pneumoniae* que producen enfermedad neumocócica invasiva, mientras que el alelo corto se relaciona con clones menos invasivos que producen patología en grupos de riesgo.
4. DiiA es un factor de virulencia de *S. pneumoniae* que presenta actividad pleiotrópica y específica de dominio en modelos murinos. La presencia de las dos repeticiones favorece el proceso de colonización, la repetición R1 media durante el paso a través del pulmón y el fragmento desestructurado es esencial para la supervivencia de la bacteria a largo plazo en el sistema circulatorio sanguíneo.
5. El fragmento desestructurado de DiiA contribuye a la interacción entre *S. pneumoniae* y su hospedador mediante la unión a colágeno y hololactoferrina. El reclutamiento de hololactoferrina inhibe la activación del sistema del complemento aunque este hecho no interfiere en la adhesión de neumococo al epitelio pulmonar.
6. Las repeticiones de DiiA son las regiones más inmunogénicas de dicha proteína tanto *in silico* como *in vitro*. La inmunización intraperitoneal e intranasal con la variante larga de DiiA genera una potente respuesta de diversos subtipos de inmunoglobulinas en suero y mucosas, respectivamente.
7. La vacunación sistémica y a nivel de mucosas con la versión de DiiA que presenta las dos repeticiones protege frente a sepsis y colonización, respectivamente, causadas en modelos murinos por la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*. En la inmunización sistémica, la protección está mediada por la activación del sistema del complemento.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aaberge, I.S., Eng, J., Lermark, G. y Lovik, M. (1995). Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microbial pathogenesis*. **18**: 141-152.
- Acebo, P., Martín-Galiano, A.J., Navarro, S., Zaballo, A. y Amblar, M. (2012). Identification of 88 regulatory small RNAs in the TIGR4 strain of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *RNA*. **18**: 530-546.
- ACIP (2000). Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and mortality weekly report*. **49**: 1-38.
- Adamou, J.E., Heinrichs, J.H., Erwin, A.L., Walsh, W., Gayle, T., Dormitzer, M., Dagan, R., Brewah, Y.A., Barren, P., Lathigra, R., Langermann, S., Koenig, S. y Johnson, S. (2001). Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. *Infection and immunity*. **69**: 949-958.
- Agarwal, V. y Hammerschmidt, S. (2009). Cdc42 and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway are essential for PspC-mediated internalization of pneumococci by respiratory epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. **284**: 19427-19436.
- Aguinagalde, L., Corsini, B., Domenech, A., Domenech, M., Cámara, J., Ardanuy, C., García, E., Liñares, J., Fenoll, A. y Yuste, J. (2015). Emergence of Amoxicillin-Resistant Variants of Spain9V-ST156 Pneumococci Expressing Serotype 11A Correlates with Their Ability to Evade the Host Immune Response. *PloS one*. **10**: e0137565.
- Akhmatova, N.K., Kurbatova, E.A., Akhmatov, E.A., Egorova, N.B., Logunov, D.Y., Gening, M.L., Sukhova, E.V., Yashunsky, D.V., Tsvetkov, Y.E. y Nifantiev, N.E. (2016). The Effect of a BSA Conjugate of a Synthetic Hexasaccharide Related to the Fragment of Capsular Polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* Type 14 on the Activation of Innate and Adaptive Immune Responses. *Frontiers in immunology*. **7**: 248.
- Ali, Y.M., Lynch, N.J., Haleem, K.S., Fujita, T., Endo, Y., Hansen, S., Holmskov, U., Takahashi, K., Stahl, G.L., Dudler, T., Girija, U.V., Wallis, R., Kadioglu, A., Stover, C.M., Andrew, P.W. y Schwaible, W.J. (2012). The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS pathogens*. **8**: e1002793.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. **215**: 403-410.
- Andersson, B., Dahmen, J., Frejd, T., Leffler, H., Magnusson, G., Noori, G. y Eden, C.S. (1983). Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J Exp Med*. **158**: 559-570.
- Anderton, J.M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A.P., Carlone, G.M., Sampson, J.S. y Ades, E.W. (2007). E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial pathogenesis*. **42**: 225-236.
- Arnold, R.R., Brewer, M. y Gauthier, J.J. (1980). Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and immunity*. **28**: 893-898.
- Attali, C., Frolet, C., Durmort, C., Offant, J., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2008). *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infection and immunity*. **76**: 466-476.
- Audouy, S.A., van Selm, S., van Roosmalen, M.L., Post, E., Kanninga, R., Neef, J., Estevao, S., Nieuwenhuis, E.E., Adrian, P.V., Leenhouts, K. y Hermans, P.W. (2007). Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. *Vaccine*. **25**: 2497-2506.
- Austrian, R. (1981). Pneumococcus: the first one hundred years. *Reviews of infectious diseases*. **3**: 183-189.
- Avery, O.T., Chickering, H.T., Cole, R. y Dochez, A.R. (1917). Acute Lobar Pneumonia. Prevention and Serum Treatment. *Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research*. **7**.
- Bagnoli, F., Moschioni, M., Donati, C., Dimitrovska, V., Ferlenghi, I., Facciotti, C., Muzzi, A., Giusti, F., Emolo, C., Sinisi, A., Hillerigmann, M., Pansegrau, W., Censini, S., Rappuoli, R., Covacci, A., Masiagnani, V. y Barocchi, M.A. (2008). A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *Journal of bacteriology*. **190**: 5480-5492.
- Ballester, S., López, P., Alonso, J.C., Espinosa, M. y Lacks, S.A. (1986). Selective advantage of deletions enhancing chloramphenicol acetyltransferase gene expression in *Streptococcus pneumoniae* plasmids. *Gene*. **41**: 153-163.
- Baron, M.J., Bolduc, G.R., Goldberg, M.B., Auferin, T.C. y Madoff, L.C. (2004). Alpha C protein of group B *Streptococcus* binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. **279**: 24714-24723.

- Barrett, D.J. y Ayoub, E.M. (1986). IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clinical and experimental immunology*. **63**: 127-134.
- Bayle, L., Chimalapati, S., Schoehn, G., Brown, J., Vernet, T. y Durmort, C. (2011). Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. *Molecular microbiology*. **82**: 904-916.
- Bergmann, S. y Hammerschmidt, S. (2006). Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*. **152**: 295-303.
- Bergmann, S., Schoenen, H. y Hammerschmidt, S. (2013). The interaction between bacterial enolase and plasminogen promotes adherence of *Streptococcus pneumoniae* to epithelial and endothelial cells. *International journal of medical microbiology : IJMM*. **303**: 452-462.
- Berry, A.M. y Paton, J.C. (2000). Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infection and immunity*. **68**: 133-140.
- Bethe, G., Nau, R., Wellmer, A., Hakenbeck, R., Reinert, R.R., Heinz, H.P. y Zysk, G. (2001). The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS microbiology letters*. **205**: 99-104.
- Beuzon, C.R. y Holden, D.W. (2001). Use of mixed infections with Salmonella strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes and infection*. **3**: 1345-1352.
- Binsker, U., Kohler, T.P., Krauel, K., Kohler, S., Habermeyer, J., Schwertz, H. y Hammerschmidt, S. (2017). Serotype 3 pneumococci sequester platelet-derived human thrombospondin-1 via the adhesin and immune evasion protein Hic. *The Journal of biological chemistry*. **292**: 5770-5783.
- Blomberg, C., Dagerhamn, J., Dahlberg, S., Browall, S., Fernebro, J., Albiger, B., Morfeldt, E., Normark, S. y Henriques-Normark, B. (2009). Pattern of accessory regions and invasive disease potential in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases*. **199**: 1032-1042.
- Bocs, S., Danchin, A. y Medigue, C. (2002). Re-annotation of genome microbial coding-sequences: finding new genes and inaccurately annotated genes. *BMC bioinformatics*. **3**: 5.
- Bologa, M., Kamtchoua, T., Hopfer, R., Sheng, X., Hicks, B., Bixler, G., Hou, V., Pehlic, V., Yuan, T. y Gurunathan, S. (2012). Safety and immunogenicity of pneumococcal protein vaccine candidates: monovalent choline-binding protein A (PcpA) vaccine and bivalent PcpA-pneumococcal histidine triad protein D vaccine. *Vaccine*. **30**: 7461-7468.
- Braun, J.S., Novak, R., Gao, G., Murray, P.J. y Shenep, J.L. (1999). Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infection and immunity*. **67**: 3750-3756.
- Briles, D.E., Hollingshead, S.K., King, J., Swift, A., Braun, P.A., Park, M.K., Ferguson, L.M., Nahm, M.H. y Nabors, G.S. (2000). Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *The Journal of infectious diseases*. **182**: 1694-1701.
- Brittan, J.L., Buckeridge, T.J., Finn, A., Kadioglu, A. y Jenkinson, H.F. (2012). Pneumococcal neuraminidase A: an essential upper airway colonization factor for *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular oral microbiology*. **27**: 270-283.
- Brooks-Walter, A., Briles, D.E. y Hollingshead, S.K. (1999). The pspC gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infection and immunity*. **67**: 6533-6542.
- Brown, J.S., Gilliland, S.M. y Holden, D.W. (2001). A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Molecular microbiology*. **40**: 572-585.
- Brown, J.S., Gilliland, S.M., Ruiz-Albert, J. y Holden, D.W. (2002a). Characterization of pit, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter. *Infection and immunity*. **70**: 4389-4398.
- Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J. y Botto, M. (2002b). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 16969-16974.
- Brown, J.S., Ogunniyi, A.D., Woodrow, M.C., Holden, D.W. y Paton, J.C. (2001b). Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and immunity*. **69**: 6702-6706.
- Cacho, J.B., Meseguer, M.A., Oliver A. y Puig, J. (2007). Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior (SEIMC).

- Cafini, F., Yuste, J., Gimenez, M.J., Sevillano, D., Aguilar, L., Alou, L., Ramos-Sevillano, E., Torrico, M., González, N., García, E., Coronel, P. y Prieto, J. (2010). Enhanced in vivo activity of cefditoren in pre-immunized mice against penicillin-resistant *S. pneumoniae* (serotypes 6B, 19F and 23F) in a sepsis model. *PLoS one*. **5**: e12041.
- Cámara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W. y Mitchell, T.J. (1994). A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infection and immunity*. **62**: 3688-3695.
- Capecchi, B., Serruto, D., Adu-Bobie, J., Rappuoli, R. y Pizza, M. (2004). The genome revolution in vaccine research. *Current issues in molecular biology*. **6**: 17-27.
- CDC (2010). Updated Recommendations for Prevention of Invasive Pneumococcal Disease Among Adults Using the 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine (PPSV23). *MMWR*. **59**: 1102-1106.
- Celik, I., Stover, C., Botto, M., Thiel, S., Tzima, S., Kunkel, D., Walport, M., Lorenz, W. y Schwaeble, W. (2001). Role of the classical pathway of complement activation in experimentally induced polymicrobial peritonitis. *Infection and immunity*. **69**: 7304-7309.
- Chiavolini, D., Pozzi, G. y Ricci, S. (2008). Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clinical microbiology reviews*. **21**: 666-685.
- Chimalapati, S., Cohen, J., Camberlein, E., Durmort, C., Baxendale, H., de Vogel, C., van Belkum, A. y Brown, J.S. (2011). Infection with conditionally virulent *Streptococcus pneumoniae* Deltapab strains induces antibody to conserved protein antigens but does not protect against systemic infection with heterologous strains. *Infection and immunity*. **79**: 4965-4976.
- Chin, C.L., Manzel, L.J., Lehman, E.E., Humlicek, A.L., Shi, L., Starner, T.D., Denning, G.M., Murphy, T.F., Sethi, S. y Look, D.C. (2005). *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. **172**: 85-91.
- Choi, E.H., Zhang, F., Ly, Y.J. y Malley, R. (2016). Capsular polysaccharide (CPS) release by serotype 3 pneumococcal strains reduces the protective effect of antitype 3 CPS antibodies. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. **23**: 162-167.
- Chothia, C., Gough, J., Vogel, C. y Teichmann, S.A. (2003). Evolution of the protein repertoire. *Science*. **300**: 1701-1703.
- Claverys, J.P. y Håvarstein, L.S. (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nature reviews Microbiology*. **5**: 219-229.
- Cobey, S. y Lipsitch, M. (2012). Niche and neutral effects of acquired immunity permit coexistence of pneumococcal serotypes. *Science*. **335**: 1376-1380.
- Coffman, R.L., Sher, A. y Seder, R.A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. **33**: 492-503.
- Coleman, J.R., Papamichail, D., Yano, M., García-Suárez Mdel, M. y Pirofski, L.A. (2011). Designed reduction of *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity via synthetic changes in virulence factor codon-pair bias. *The Journal of infectious diseases*. **203**: 1264-1273.
- Collins, A.M., Rylance, J., Wootton, D.G., Wright, A.D., Wright, A.K., Fullerton, D.G. y Gordon, S.B. (2014). Bronchoalveolar lavage (BAL) for research; obtaining adequate sample yield. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Consortium, T.U. (2012). Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. **40**: D71-75.
- Corsini, B., Aguinalde, L., Ruiz, S., Domenech, M., Antequera, M.L., Fenoll, A., García, P., García, E. y Yuste, J. (2016). Immunization with LytB protein of *Streptococcus pneumoniae* activates complement-mediated phagocytosis and induces protection against pneumonia and sepsis. *Vaccine*. **34**: 6148-6157.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkilä, I. y Tuomanen, E.I. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*. **377**: 435-438.
- Czechowska, K., McKeithen-Mead, S., Al Moussawi, K. y Kazmierczak, B.I. (2014). Cheating by type 3 secretion system-negative *Pseudomonas aeruginosa* during pulmonary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**: 7801-7806.
- Dagan, R. (2009). Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **3**: 16-20.
- Dalia, A.B. y Weiser, J.N. (2011). Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody. *Cell host & microbe*. **10**: 486-496.

- Daniels, C.C., Rogers, P.D. y Shelton, C.M. (2016). A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG*. **21**: 27-35.
- Das, R., LaRose, M.I., Hergott, C.B., Leng, L., Bucala, R. y Weiser, J.N. (2014). Macrophage migration inhibitory factor promotes clearance of pneumococcal colonization. *J Immunol*. **193**: 764-772.
- Davies, J.R., Svensater, G. y Herzberg, M.C. (2009). Identification of novel LPXTG-linked surface proteins from *Streptococcus gordonii*. *Microbiology*. **155**: 1977-1988.
- del Pozo, J.L. (2008). Update and actual trends on bacterial infections following liver transplantation. *World journal of gastroenterology*. **14**: 4977-4983.
- Denoe, P., Godfroid, F., Hermand, P., Verlant, V. y Poolman, J. (2011). Combined protective effects of anti-PhtD and anti-pneumococcal polysaccharides. *Vaccine*. **29**: 6451-6453.
- Diavatopoulos, D.A., Short, K.R., Price, J.T., Wilksch, J.J., Brown, L.E., Briles, D.E., Strugnell, R.A. y Wijburg, O.L. (2010). Influenza A virus facilitates *Streptococcus pneumoniae* transmission and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **24**: 1789-1798.
- Dieudonne-Vatran, A., Krentz, S., Blom, A.M., Meri, S., Henriques-Normark, B., Riesbeck, K. y Albiger, B. (2009). Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion. *J Immunol*. **182**: 7865-7877.
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C. y Claverys, J.P. (1997). Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Molecular microbiology*. **25**: 727-739.
- Dombek, P.E., Cue, D., Sedgewick, J., Lam, H., Ruschkowski, S., Finlay, B.B. y Cleary, P.P. (1999). High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Molecular microbiology*. **31**: 859-870.
- Dombek, P.E., Cue, D., Sedgewick, J., Lam, H., Ruschkowski, S., Finlay, B.B. y Cleary, P.P. (1999). High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Molecular microbiology*. **31**: 859-870.
- Domenech, A., Ardanuy, C., Grau, I., Calatayud, L., Pallarés, R., Fenoll, A., Brueggemann, A.B. y Liñares, J. (2014). Evolution and genetic diversity of the Spain23F-ST81 clone causing adult invasive pneumococcal disease in Barcelona (1990-2012). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. **69**: 924-931.
- Domenech, A., Moreno, J., Ardanuy, C., Liñares, J., de la Campa, A.G. y Martín-Galiano, A.J. (2016). A Novel Typing Method for *Streptococcus pneumoniae* Using Selected Surface Proteins. *Frontiers in microbiology*. **7**: 420.
- Domenech, M., García, E., Prieto, A. y Moscoso, M. (2013). Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environmental microbiology*. **15**: 502-516.
- Donati, C., Hiller, N.L., Tettelin, H., Muzzi, A., Croucher, N.J., Angiuoli, S.V., Oggioni, M., Dunning Hotopp, J.C., Hu, F.Z., Riley, D.R., Covacci, A., Mitchell, T.J., Bentley, S.D., Kilian, M., Ehrlich, G.D., Rappuoli, R., Moxon, E.R. y Maignani, V. (2010). Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. *Genome biology*. **11**: R107.
- Elberse, K., Witteveen, S., van der Heide, H., van de Pol, I., Schot, C., van der Ende, A., Berbers, G. y Schouls, L. (2011). Sequence diversity within the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae* serogroup 6 and 19. *PloS one*. **6**: e25018.
- Endo, Y., Takahashi, M., Iwaki, D., Ishida, Y., Nakazawa, N., Kodama, T., Matsuzaka, T., Kanno, K., Liu, Y., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Ikawa, M., Waguri, S., Wada, I., Matsushita, M., Schwaible, W.J. y Fujita, T. (2012). Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol*. **189**: 5860-5866.
- Exley, R.M., Shaw, J., Mowe, E., Sun, Y.H., West, N.P., Williamson, M., Botto, M., Smith, H. y Tang, C.M. (2005). Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement. *J Exp Med*. **201**: 1637-1645.
- Feikin, D.R., Kagucia, E.W., Loo, J.D., Link-Gelles, R., Puhon, M.A., Cherian, T., Levine, O.S., Whitney, C.G., O'Brien, K.L. y Moore, M.R. (2013). Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS medicine*. **10**: e1001517.
- Feldman, C. y Anderson, R. (2014). Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *J Infect*. **69**: 309-325.
- Feldman, C. y Anderson, R. (2016). Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. *F1000Research*. **5**: 2320.

- Feldman, C., Cockeran, R., Jedrzejewski, M.J., Mitchell, T.J. y Anderson, R. (2007). Hyaluronidase augments pneumolysin-mediated injury to human ciliated epithelium. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. **11**: 11-15.
- Fenner, F.H., DA.; Arita, L.; Jezek, Z.; Ladnyi, ID. (1988). Smallpox and its eradication (Geneva: World Health Organization).
- Fraenkel, A. (1886). Weitere Beiträge zur Lehre von den Mikrokokken bei der genuinen fibrinösen Pneumonie. *Z Klin Med*. **5**: 437-458.
- Freund, J. (1956). The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibliotheca tuberculosea*. 130-148.
- Frolet, C., Beniazza, M., Roux, L., Gallet, B., Noirclerc-Savoye, M., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2010). New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC microbiology*. **10**: 190.
- Frolet, C., Beniazza, M., Roux, L., Gallet, B., Noirclerc-Savoye, M., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2010). New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC microbiology*. **10**: 190.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. y Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*. **13**: 34-40.
- Gao, J., Ma, L., Liu, D. y Wang, Z. (2012). Microarray-based technology for glycomics analysis. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. **15**: 90-99.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R. y García, J.L. (1999a). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Molecular microbiology*. **31**: 1275-1281.
- García, P., Paz González, M., García, E., García, J.L. y López, R. (1999b). The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Molecular microbiology*. **33**: 128-138.
- Garmendia, J., Viadas, C., Calatayud, L., Mell, J.C., Martí-Llitas, P., Euba, B., Llobet, E., Gil, C., Bengoechea, J.A., Redfield, R.J. y Liñares, J. (2014). Characterization of nontypable *Haemophilus influenzae* isolates recovered from adult patients with underlying chronic lung disease reveals genotypic and phenotypic traits associated with persistent infection. *PloS one*. **9**: e97020.
- Ghio, A.J., Carter, J.D., Dailey, L.A., Devlin, R.B. y Samet, J.M. (1999). Respiratory epithelial cells demonstrate lactoferrin receptors that increase after metal exposure. *The American journal of physiology*. **276**: L933-940.
- Gianfaldoni, C., Censini, S., Hilleringmann, M., Moschioni, M., Facciotti, C., Pansegrau, W., Massignani, V., Covacci, A., Rappuoli, R., Barocchi, M.A. y Ruggiero, P. (2007). *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infection and immunity*. **75**: 1059-1062.
- Giefing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Bui, M.D., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B.M., Schunn, M., Habel, A., Henriques-Normark, B., Ortqvist, A., Kalin, M., von Gabain, A. y Nagy, E. (2008). Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med*. **205**: 117-131.
- Gilbert, R.J., Jiménez, J.L., Chen, S., Tickle, I.J., Rossjohn, J., Parker, M., Andrew, P.W. y Saibil, H.R. (1999). Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell*. **97**: 647-655.
- Gingles, N.A., Alexander, J.E., Kadioglu, A., Andrew, P.W., Kerr, A., Mitchell, T.J., Hopes, E., Denny, P., Brown, S., Jones, H.B., Little, S., Booth, G.C. y McPheat, W.L. (2001). Role of genetic resistance in invasive pneumococcal infection: identification and study of susceptibility and resistance in inbred mouse strains. *Infection and immunity*. **69**: 426-434.
- Ginsburg, A.S. y Alderson, M.R. (2011). New conjugate vaccines for the prevention of pneumococcal disease in developing countries. *Drugs Today (Barc)*. **47**: 207-214.
- Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Zouine, M., Couve, E., Lalioui, L., Poyart, C., Trieu-Cuot, P. y Kunst, F. (2002). Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular microbiology*. **45**: 1499-1513.
- Glover, D.T., Hollingshead, S.K. y Briles, D.E. (2008). *Streptococcus pneumoniae* surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis. *Infection and immunity*. **76**: 2767-2776.
- Godfroid, F., Hermand, P., Verlant, V., Denoel, P. y Poolman, J.T. (2011). Preclinical evaluation of the Pht proteins as potential cross-protective pneumococcal vaccine antigens. *Infection and immunity*. **79**: 238-245.
- Goding, J.W. (1993). Antibody Structure and Function. In *Monoclonal Antibodies: principles and practice*. London: Academic Press, London.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I. y Masure, H.R. (2000). Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **68**: 5690-5695.

- Grabenstein, J.D. y Musey, L.K. (2014). Differences in serious clinical outcomes of infection caused by specific pneumococcal serotypes among adults. *Vaccine*. **32**: 2399-2405.
- Grandi, G. (2001). Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. *Trends in biotechnology*. **19**: 181-188.
- Grau, I., Ardanuy, C., Calatayud, L., Rolo, D., Domenech, A., Liñares, J. y Pallarés, R. (2012). Invasive pneumococcal disease in healthy adults: increase of empyema associated with the clonal-type Sweden(1)-ST306. *PloS one*. **7**: e42595.
- Gravekamp, C., Kasper, D.L., Michel, J.L., Kling, D.E., Carey, V. y Madoff, L.C. (1997). Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. *Infection and immunity*. **65**: 5216-5221.
- Gravekamp, C., Rosner, B. y Madoff, L.C. (1998). Deletion of repeats in the alpha C protein enhances the pathogenicity of group B streptococci in immune mice. *Infection and immunity*. **66**: 4347-4354.
- Greenberg, D., Givon-Lavi, N., Newman, N., Bar-Ziv, J. y Dagan, R. (2011). Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric pneumonia as a means to estimate serotype disease potential. *The Pediatric infectious disease journal*. **30**: 227-233.
- Hamel, J., Charland, N., Pineau, I., Ouellet, C., Rioux, S., Martín, D. y Brodeur, B.R. (2004). Prevention of pneumococcal disease in mice immunized with conserved surface-accessible proteins. *Infection and immunity*. **72**: 2659-2670.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H. y Chhatwal, G.S. (1999). Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **67**: 1683-1687.
- Hammerschmidt, S., Tillig, M.P., Wolff, S., Vaerman, J.P. y Chhatwal, G.S. (2000). Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Molecular microbiology*. **36**: 726-736.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. **166**: 557-580.
- Hassell, A.M., An, G., Bledsoe, R.K., Bynum, J.M., Carter, H.L., 3rd, Deng, S.J., Gampe, R.T., Grisard, T.E., Madauss, K.P., Nolte, R.T., Rocque, W.J., Wang, L., Weaver, K.L., Williams, S.P., Wisely, G.B., Xu, R. y Shewchuk, L.M. (2007). Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. **63**: 72-79.
- Hava, D.L. y Camilli, A. (2002). Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Molecular microbiology*. **45**: 1389-1406.
- Hava, D.L., LeMieux, J. y Camilli, A. (2003). From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Molecular microbiology*. **50**: 1103-1110.
- Henriques, B., Kalin, M., Ortqvist, A., Olsson Liljequist, B., Almela, M., Marrie, T.J., Mufson, M.A., Torres, A., Woodhead, M.A., Svenson, S.B. y Kallenius, G. (2000). Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *The Journal of infectious diseases*. **182**: 833-839.
- Henriques-Normark, B. y Tuomanen, E.I. (2013). The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. **3**.
- Hilleman, M.R., Carlson, A.J., Jr., McLean, A.A., Vella, P.P., Weibel, R.E. y Woodhour, A.F. (1981). *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide vaccine: age and dose responses, safety, persistence of antibody, revaccination, and simultaneous administration of pneumococcal and influenza vaccines. *Reviews of infectious diseases*. **3 Suppl 15**: 31-42.
- Hiller, N.L., Janto, B., Hogg, J.S., Boissy, R., Yu, S., Powell, E., Keefe, R., Ehrlich, N.E., Shen, K., Hayes, J., Barbadora, K., Klimke, W., Dernovoy, D., Tatusova, T., Parkhill, J., Bentley, S.D., Post, J.C., Ehrlich, G.D. y Hu, F.Z. (2007). Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insights into the pneumococcal supragenome. *Journal of bacteriology*. **189**: 8186-8195.
- Hilleringmann, M., Giusti, F., Baudner, B.C., Massignani, V., Covacci, A., Rappuoli, R., Barocchi, M.A. y Ferlenghi, I. (2008). Pneumococcal pili are composed of protofilaments exposing adhesive clusters of Rrg A. *PLoS pathogens*. **4**: e1000026.
- Hilleringmann, M., Ringler, P., Muller, S.A., De Angelis, G., Rappuoli, R., Ferlenghi, I. y Engel, A. (2009). Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 pili. *The EMBO journal*. **28**: 3921-3930.
- Hollingshead, S.K., Baril, L., Ferro, S., King, J., Coan, P. y Briles, D.E. (2006). Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. *Journal of medical microbiology*. **55**: 215-221.
- Hollingshead, S.K., Becker, R. y Briles, D.E. (2000). Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **68**: 5889-5900.

- Honsa, E.S., Johnson, M.D. y Rosch, J.W. (2013). The roles of transition metals in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. **3**: 92.
- Hussain, M., Melegaro, A., Pebody, R.G., George, R., Edmunds, W.J., Talukdar, R., Martín, S.A., Efstratiou, A. y Miller, E. (2005). A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. *Epidemiology and infection*. **133**: 891-898.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K. y Brown, J.S. (2010). The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and immunity*. **78**: 704-715.
- Hyams, C., Trzcinski, K., Camberlein, E., Weinberger, D.M., Chimalapati, S., Noursadeghi, M., Lipsitch, M. y Brown, J.S. (2013). *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype invasiveness correlates with the degree of factor H binding and opsonization with C3b/iC3b. *Infection and immunity*. **81**: 354-363.
- Iannelli, F., Chiavolini, D., Ricci, S., Oggioni, M.R. y Pozzi, G. (2004). Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infection and immunity*. **72**: 3077-3080.
- Iannelli, F., Oggioni, M.R. y Pozzi, G. (2002). Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*. **284**: 63-71.
- Jackson, L.A., Gurtman, A., van Cleeff, M., Jansen, K.U., Jayawardene, D., Devlin, C., Scott, D.A., Emini, E.A., Gruber, W.C. y Schmoele-Thoma, B. (2013). Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults. *Vaccine*. **31**: 3577-3584.
- Jado, I., Fenoll, A., Casal, J. y Pérez, A. (2001). Identification of the *psaA* gene, coding for pneumococcal surface adhesin A, in viridans group streptococci other than *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. **8**: 895-898.
- Jang, A.Y., Seo, H.S., Lim, S., Chung, G.H., Kim, H.W., Zhao, L., Park, I.H., Lim, J.H. y Kim, K.H. (2017). Molecular Characterization of Pneumococcal Surface Protein K, a Potential Pneumococcal Vaccine Antigen. *Virulence*. **6**: 1-16.
- Janoff, E.N., Rubins, J.B., Fasching, C., Charboneau, D., Rahkola, J.T., Plaut, A.G. y Weiser, J.N. (2014). Pneumococcal IgA1 protease subverts specific protection by human IgA1. *Mucosal immunology*. **7**: 249-256.
- Jedrzejewski, M.J. (2001). Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. **65**: 187-207.
- Jedrzejewski, M.J. (2007). Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **64**: 2799-2822.
- Jeffery, P.K. (1987). The origins of secretions in the lower respiratory tract. *European journal of respiratory diseases Supplement*. **153**: 34-42.
- Johnsborg, O. y Havarstein, L.S. (2009). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS microbiology reviews*. **33**: 627-642.
- Jones, D.T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology*. **292**: 195-202.
- Kadioglu, A. y Andrew, P.W. (2005). Susceptibility and resistance to pneumococcal disease in mice. *Briefings in functional genomics & proteomics*. **4**: 241-247.
- Kall, L., Krogh, A. y Sonnhammer, E.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular biology*. **338**: 1027-1036.
- Kall, L., Krogh, A. y Sonnhammer, E.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular biology*. **338**: 1027-1036.
- Kallio, A., Sepponen, K., Hermand, P., Denoel, P., Godfroid, F. y Melin, M. (2014). Role of Pht proteins in attachment of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells. *Infection and immunity*. **82**: 1683-1691.
- Kamboj, K.K., Kirchner, H.L., Kimmel, R., Greenspan, N.S. y Schreiber, J.R. (2003). Significant variation in serotype-specific immunogenicity of the seven-valent *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-CRM197 conjugate vaccine occurs despite vigorous T cell help induced by the carrier protein. *The Journal of infectious diseases*. **187**: 1629-1638.
- Kamerling, J.P. (2000). Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology and Mechanisms of Disease*. Mary Ann Liebert Inc, New York.
- Kamtchoua, T., Bologa, M., Hopfer, R., Neveu, D., Hu, B., Sheng, X., Corde, N., Pouzet, C., Zimmermann, G. y Gurunathan, S. (2013). Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults. *Vaccine*. **31**: 327-333.

- Kaplan, S.L., Mason, E.O., Jr., Wald, E.R., Schutze, G.E., Bradley, J.S., Tan, T.Q., Hoffman, J.A., Givner, L.B., Yogev, R. y Barson, W.J. (2004). Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*. **113**: 443-449.
- Khan, M.N. y Pichichero, M.E. (2013). CD4 T cell memory and antibody responses directed against the pneumococcal histidine triad proteins PhtD and PhtE following nasopharyngeal colonization and immunization and their role in protection against pneumococcal colonization in mice. *Infection and immunity*. **81**: 3781-3792.
- Khan, M.N., Sharma, S.K., Filkins, L.M. y Pichichero, M.E. (2012). PcpA of *Streptococcus pneumoniae* mediates adherence to nasopharyngeal and lung epithelial cells and elicits functional antibodies in humans. *Microbes and infection*. **14**: 1102-1110.
- Kilian, M., Mestecky, J. y Schrohenloher, R.E. (1979). Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infection and immunity*. **26**: 143-149.
- Kim, J.O. y Weiser, J.N. (1998). Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases*. **177**: 368-377.
- King, S.J., Hippe, K.R. y Weiser, J.N. (2006). Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*. **59**: 961-974.
- Kingsford, C.L., Ayanbule, K. y Salzberg, S.L. (2007). Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome biology*. **8**: R22.
- Kolaskar, A.S. y Tongaonkar, P.C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*. **276**: 172-174.
- Kono, M., Hotomi, M., Hollingshead, S.K., Briles, D.E. y Yamanaka, N. (2011). Maternal immunization with pneumococcal surface protein A protects against pneumococcal infections among derived offspring. *PloS one*. **6**: e27102.
- Koretke, K.K., Szczesny, P., Gruber, M. y Lupas, A.N. (2006). Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of structural biology*. **155**: 154-161.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lanie, J.A., Ng, W.L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., Tettelin, H., Glass, J.I. y Winkler, M.E. (2007). Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *Journal of bacteriology*. **189**: 38-51.
- Larsen, J.E., Lund, O. y Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*. **2**: 2.
- Lin, I.H., Hsu, M.T. y Chang, C.H. (2012). Protein domain repetition is enriched in Streptococcal cell-surface proteins. *Genomics*. **100**: 370-379.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J. y Russell, R.B. (2003). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*. **11**: 1453-1459.
- Lock, R.A., Paton, J.C. y Hansman, D. (1988). Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial pathogenesis*. **5**: 461-467.
- Long, J.P., Tong, H.H. y DeMaria, T.F. (2004). Immunization with native or recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase affords protection in the chinchilla otitis media model. *Infection and immunity*. **72**: 4309-4313.
- López, R. y García, E. (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS microbiology reviews*. **28**: 553-580.
- López, R., González, M.P., García, E., García, J.L. y García, P. (2000). Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Research in microbiology*. **151**: 437-443.
- Lottenbach, K.R., Mink, C.M., Barenkamp, S.J., Anderson, E.L., Homan, S.M. y Powers, D.C. (1999). Age-associated differences in immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 subclass antibodies to pneumococcal polysaccharides following vaccination. *Infection and immunity*. **67**: 4935-4938.
- Lupas, A., Van Dyke, M. y Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*. **252**: 1162-1164.

- Lutge, M., Fulde, M., Talay, S.R., Nerlich, A., Rohde, M., Preissner, K.T., Hammerschmidt, S., Steinert, M., Mitchell, T.J., Chhatwal, G.S. y Bergmann, S. (2012). *Streptococcus pneumoniae* induces exocytosis of Weibel-Palade bodies in pulmonary endothelial cells. *Cellular microbiology*. **14**: 210-225.
- EL-Malky, M.A., Al-Harthi, S.A., Mohamed, R.T., EL Bali, M.A. y Saady, N.S. (2014). Vaccination with Toxoplasma lysate antigen and CpG oligodeoxynucleotides: comparison of immune responses in intranasal versus intramuscular administrations. *Parasitology research*. **113**: 2277-2284.
- Macheboeuf, P., Buffalo, C., Fu, C.Y., Zinkernagel, A.S., Cole, J.N., Johnson, J.E., Nizet, V. y Ghosh, P. (2011). Streptococcal M1 protein constructs a pathological host fibrinogen network. *Nature*. **472**: 64-68.
- Macleod, C.M., Hodges, R.G., Heidelberger, M. y Bernhard, W.G. (1945). Prevention of Pneumococcal Pneumonia by Immunization with Specific Capsular Polysaccharides. *J Exp Med*. **82**: 445-465.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. y Spratt, B.G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**: 3140-3145.
- Malcolm, T.L., Robinson le, D., Klika, A.K., Ramanathan, D., Higuera, C.A. y Murray, T.G. (2016). Predictors of *Staphylococcus aureus* Colonization and Results after Decolonization. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. **2016**: 4367156.
- Malley, R., Lipsitch, M., Stack, A., Saladino, R., Fleisher, G., Pelton, S., Thompson, C., Briles, D. y Anderson, P. (2001). Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. *Infection and immunity*. **69**: 4870-4873.
- Mann, B., Thornton, J., Heath, R., Wade, K.R., Tweten, R.K., Gao, G., El Kasmi, K., Jordan, J.B., Mitrea, D.M., Kriwacki, R., Maisonneuve, J., Alderson, M. y Tuomanen, E.I. (2014). Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein. *The Journal of infectious diseases*. **209**: 1116-1125.
- Manso, A.S., Chai, M.H., Atack, J.M., Furi, L., De Ste Croix, M., Haigh, R., Trappetti, C., Ogunniyi, A.D., Shewell, L.K., Boitano, M., Clark, T.A., Korlach, J., Blades, M., Mirkes, E., Gorban, A.N., Paton, J.C., Jennings, M.P. y Oggioni, M.R. (2014). A random six-phase switch regulates pneumococcal virulence via global epigenetic changes. *Nature communications*. **5**: 5055.
- Marques, J.M., Rial, A., Muñoz, N., Pellay, F.X., Van Maele, L., Leger, H., Camou, T., Sirard, J.C., Benecke, A. y Chabalgoity, J.A. (2012). Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN-gamma-mediated immunity. *Immunobiology*. **217**: 420-429.
- Marrack, P., McKee, A.S. y Munks, M.W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature reviews Immunology*. **9**: 287-293.
- Marriott, H.M., Mitchell, T.J. y Dockrell, D.H. (2008). Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Current molecular medicine*. **8**: 497-509.
- Martín-Galiano, A.J. (2017). The MiiA motif is a common marker present in polytopic surface proteins of oral and urinary tract invasive bacteria. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. **49**: 283-292.
- McCullers, J.A. y Tuomanen, E.I. (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. **6**: D877-889.
- McDaniel, L.S. y Swiatlo, E. (2016). Should Pneumococcal Vaccines Eliminate Nasopharyngeal Colonization? *mBio*. **7**.
- McDonnell, A.V., Jiang, T., Keating, A.E. y Berger, B. (2006). Paircoil2: improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics*. **22**: 356-358.
- McKee, C.M., Penno, M.B., Cowman, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C. y Noble, P.W. (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*. **98**: 2403-2413.
- McNeela, E.A., Burke, A., Neill, D.R., Baxter, C., Fernandes, V.E., Ferreira, D., Smeaton, S., El-Rachkidy, R., McLoughlin, R.M., Mori, A., Moran, B., Fitzgerald, K.A., Tschopp, J., Petrilli, V., Andrew, P.W., Kadioglu, A. y Lavelle, E.C. (2010). Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS pathogens*. **6**: e1001191.
- McShan, W.M., Ferretti, J.J., Karasawa, T., Suvorov, A.N., Lin, S., Qin, B., Jia, H., Kenton, S., Najar, F., Wu, H., Scott, J., Roe, B.A. y Savic, D.J. (2008). Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of bacteriology*. **190**: 7773-7785.

- Mestas, J. y Hughes, C.C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* **172**: 2731-2738.
- Mikula, K.M., Kolodziejczyk, R. y Goldman, A. (2012). Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* **2**: 169.
- Millar, E.V., O'Brien, K.L., Watt, J.P., Bronsdon, M.A., Dallas, J., Whitney, C.G., Reid, R. y Santosham, M. (2006). Effect of community-wide conjugate pneumococcal vaccine use in infancy on nasopharyngeal carriage through 3 years of age: a cross-sectional study in a high-risk population. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* **43**: 8-15.
- Miller, E., Andrews, N.J., Waight, P.A., Slack, M.P. y George, R.C. (2011). Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *The Lancet Infectious diseases.* **11**: 760-768.
- Mir, K., Neuhaus, K., Scherer, S., Bossert, M. y Schober, S. (2012). Predicting statistical properties of open reading frames in bacterial genomes. *PloS one.* **7**: e45103.
- Mirza, S., Wilson, L., Benjamin, W.H., Jr., Novak, J., Barnes, S., Hollingshead, S.K. y Briles, D.E. (2011). Serine protease PrtA from *Streptococcus pneumoniae* plays a role in the killing of *S. pneumoniae* by apolactoferrin. *Infection and immunity.* **79**: 2440-2450.
- Moffitt, K.L. y Malley, R. (2011). Next generation pneumococcal vaccines. *Current opinion in immunology.* **23**: 407-413.
- Moffitt, K.L., Gierahn, T.M., Lu, Y.J., Gouveia, P., Alderson, M., Flechtner, J.B., Higgins, D.E. y Malley, R. (2011). T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell host & microbe.* **9**: 158-165.
- Mohan, T., Verma, P. y Rao, D.N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian journal of medical research.* **138**: 779-795.
- Monterrubio-López, G.P., González, Y.M.J.A. y Ribas-Aparicio, R.M. (2015). Identification of Novel Potential Vaccine Candidates against Tuberculosis Based on Reverse Vaccinology. *BioMed research international.* **2015**: 483150.
- Morales, M., Martín-Galiano, A.J., Domenech, M. y García, E. (2015). Insights into the Evolutionary Relationships of LytA Autolysin and Ply Pneumolysin-Like Genes in *Streptococcus pneumoniae* and Related Streptococci. *Genome biology and evolution.* **7**: 2747-2761.
- Moreno, A.T., Oliveira, M.L., Ferreira, D.M., Ho, P.L., Darrieux, M., Leite, L.C., Ferreira, J.M., Jr., Pimenta, F.C., Andrade, A.L. y Miyaji, E.N. (2010). Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. *Clinical and vaccine immunology : CVI.* **17**: 439-446.
- Moreno-Fierros, L., García, N., Gutiérrez, R., López-Revilla, R. y Vázquez-Padrón, R.I. (2000). Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin CryIAC from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes and infection.* **2**: 885-890.
- Morrison, D.A. (1978). Transformation in pneumococcus: protein content of eclipse complex. *Journal of bacteriology.* **136**: 548-557.
- Moschioni, M., De Angelis, G., Harfouche, C., Bizzarri, E., Filippini, S., Mori, E., Mancuso, G., Doro, F., Barocchi, M.A., Ruggiero, P. y Massignani, V. (2012). Immunization with the RrgB321 fusion protein protects mice against both high and low pilus-expressing *Streptococcus pneumoniae* populations. *Vaccine.* **30**: 1349-1356.
- Moscato, M., García, E. y López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *Journal of bacteriology.* **188**: 7785-7795.
- Mukerji, R., Mirza, S., Roche, A.M., Widener, R.W., Croney, C.M., Rhee, D.K., Weiser, J.N., Szalai, A.J. y Briles, D.E. (2012). Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. *J Immunol.* **189**: 5327-5335.
- Muñoz-Almagro, C., Selva, L., Sánchez, C.J., Esteva, C., de Sevilla, M.F., Pallarés, R. y Orihuela, C.J. (2010). PspA, a protective pneumococcal antigen, is highly prevalent in children with pneumonia and is strongly associated with clonal type. *Clinical and vaccine immunology : CVI.* **17**: 1672-1678.
- Muñoz-Almagro, C., Selva, L., Sánchez, C.J., Esteva, C., de Sevilla, M.F., Pallarés, R. y Orihuela, C.J. (2010). PspA, a protective pneumococcal antigen, is highly prevalent in children with pneumonia and is strongly associated with clonal type. *Clinical and vaccine immunology : CVI.* **17**: 1672-1678.
- Myint, T.T., Madhava, H., Balmer, P., Christopoulou, D., Attal, S., Menegas, D., Sprenger, R. y Bonnet, E. (2013). The impact of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease: a literature review. *Advances in therapy.* **30**: 127-151.

- Neef, J., Andisi, V.F., Kim, K.S., Kuipers, O.P. y Bijlsma, J.J. (2011). Deletion of a cation transporter promotes lysis in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **79**: 2314-2323.
- Neill, D.R., Coward, W.R., Gritzfeld, J.F., Richards, L., García-García, F.J., Dotor, J., Gordon, S.B. y Kadioglu, A. (2014). Density and duration of pneumococcal carriage is maintained by transforming growth factor beta1 and T regulatory cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. **189**: 1250-1259.
- Nelson, A.L., Ries, J., Bagnoli, F., Dahlberg, S., Falker, S., Rounioja, S., Tschop, J., Morfeldt, E., Ferlenghi, I., Hilleringmann, M., Holden, D.W., Rappuoli, R., Normark, S., Barocchi, M.A. y Henriques-Normark, B. (2007a). RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*. **66**: 329-340.
- Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J. y Weiser, J.N. (2007b). Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infection and immunity*. **75**: 83-90.
- Neufeld, F. (1902). Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination. *Z Hyg Infektionskr.* **40**: 54-72.
- Novak, R., Braun, J.S., Charpentier, E. y Tuomanen, E. (1998). Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Molecular microbiology*. **29**: 1285-1296.
- Ogunniyi, A.D., Giammarinaro, P. y Paton, J.C. (2002). The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo*. *Microbiology*. **148**: 2045-2053.
- Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Briles, D.E., Cook, J. y Paton, J.C. (2007). Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **75**: 350-357.
- Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Mahdi, L.K., Cook, J., Gordon, D.L., Sadlon, T.A. y Paton, J.C. (2009). Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn²⁺-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **23**: 731-738.
- Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Mahdi, L.K., Cook, J., Gordon, D.L., Sadlon, T.A. y Paton, J.C. (2009). Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn²⁺-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **23**: 731-738.
- Olliver, M., Hiew, J., Mellroth, P., Henriques-Normark, B. y Bergman, P. (2011). Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **79**: 4210-4217.
- Ortqvist, A., Hedlund, J., Burman, L.A., Elbel, E., Hofer, M., Leinonen, M., Lindblad, I., Sundelof, B. y Kalin, M. (1998). Randomised trial of 23-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in prevention of pneumonia in middle-aged and elderly people. Swedish Pneumococcal Vaccination Study Group. *Lancet*. **351**: 399-403.
- Overturf, G.D. (2000). American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*. **106**: 367-376.
- Papasergi, S., Lanza Cariccio, V., Pietrocola, G., Domina, M., D'Aliberti, D., Trunfio, M.G., Signorino, G., Peppoloni, S., Biondo, C., Mancuso, G., Midiri, A., Rindi, S., Teti, G., Speziale, P., Felici, F. y Beninati, C. (2013). Immunogenic properties of *Streptococcus agalactiae* FbsA fragments. *PloS one*. **8**: e75266.
- Paradiso, P.R. (2012). Pneumococcal conjugate vaccine for adults: a new paradigm. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. **55**: 259-264.
- Park, I.H., Geno, K.A., Yu, J., Oliver, M.B., Kim, K.H. y Nahm, M.H. (2015). Genetic, biochemical, and serological characterization of a new pneumococcal serotype, 6H, and generation of a pneumococcal strain producing three different capsular repeat units. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. **22**: 313-318.
- Parker, J.M., Guo, D. y Hodges, R.S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. **25**: 5425-5432.
- Pasteur, L. (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bulletin de l'Academie de Medecine*. **10**: 94-103.
- Pasteur, L. (1880). De l'attenuation du virus du Choléra des poules. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. **91**: 673-680.

- Paton, J.C., Lock, R.A. y Hansman, D.J. (1983). Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **40**: 548-552.
- Paton, J.C., Rowan-Kelly, B. y Ferrante, A. (1984). Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infection and immunity*. **43**: 1085-1087.
- Pelton, S.I., Loughlin, A.M. y Marchant, C.D. (2004). Seven valent pneumococcal conjugate vaccine immunization in two Boston communities: changes in serotypes and antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates. *The Pediatric infectious disease journal*. **23**: 1015-1022.
- Pérez-Dorado, I., Galan-Bartual, S. y Hermoso, J.A. (2012). Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Molecular oral microbiology*. **27**: 221-245.
- Perlmuter, R.M., Hansburg, D., Briles, D.E., Nicolotti, R.A. y Davie, J.M. (1978). Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J Immunol*. **121**: 566-572.
- Phillips, G.N., Jr., Flicker, P.F., Cohen, C., Manjula, B.N. y Fischetti, V.A. (1981). Streptococcal M protein: alpha-helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **78**: 4689-4693.
- Pilishvili, T., Lexau, C., Farley, M.M., Hadler, J., Harrison, L.H., Bennett, N.M., Reingold, A., Thomas, A., Schaffner, W., Craig, A.S., Smith, P.J., Beall, B.W., Whitney, C.G. y Moore, M.R. (2010). Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *The Journal of infectious diseases*. **201**: 32-41.
- Plumtre, C.D., Ogunniyi, A.D. y Paton, J.C. (2013). Vaccination against *Streptococcus pneumoniae* using truncated derivatives of polyhistidine triad protein D. *PloS one*. **8**: e78916.
- Poehling, K.A., Szilagyi, P.G., Grijalva, C.G., Martin, S.W., LaFleur, B., Mitchel, E., Barth, R.D., Nuorti, J.P. y Griffin, M.R. (2007). Reduction of frequent otitis media and pressure-equalizing tube insertions in children after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*. **119**: 707-715.
- Poolman, J., Kriz, P., Feron, C., Di-Paolo, E., Henckaerts, I., Miseur, A., Wauters, D., Prymula, R. y Schuerman, L. (2009). Pneumococcal serotype 3 otitis media, limited effect of polysaccharide conjugate immunisation and strain characteristics. *Vaccine*. **27**: 3213-3222.
- Price, M.N., Huang, K.H., Alm, E.J. y Arkin, A.P. (2005). A novel method for accurate operon predictions in all sequenced prokaryotes. *Nucleic Acids Res*. **33**: 880-892.
- Punta, M., Coghill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A. y Finn, R.D. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*. **40**: D290-301.
- Quin, L.R., Onwubiko, C., Moore, Q.C., Mills, M.F., McDaniel, L.S. y Carmicle, S. (2007). Factor H binding to PspC of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines in vitro and enhances invasion of mouse lungs in vivo. *Infection and immunity*. **75**: 4082-4087.
- Rainard, P. (1993). Activation of the classical pathway of complement by binding of bovine lactoferrin to unencapsulated *Streptococcus agalactiae*. *Immunology*. **79**: 648-652.
- Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E. y Yuste, J. (2011). Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PloS one*. **6**: e23626.
- Ramos-Sevillano, E., Rodríguez-Sosa, C., Cafini, F., Gimenez, M.J., Navarro, A., Sevillano, D., Alou, L., García, E., Aguilar, L. y Yuste, J. (2012). Cefditoren and ceftriaxone enhance complement-mediated immunity in the presence of specific antibodies against antibiotic-resistant pneumococcal strains. *PloS one*. **7**: e44135.
- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S., Moscoso, M., González-Camacho, F., Domenech, M., Rodríguez de Córdoba, S., Sánchez-Madrid, F., Brown, J.S., García, E. y Yuste, J. (2015). Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infection and immunity*. **83**: 591-603.
- Rapport, M.M., Linker, A. y Meyer, K. (1951). The hydrolysis of hyaluronic acid by pneumococcal hyaluronidase. *The Journal of biological chemistry*. **192**: 283-291.
- Rappuoli, R. (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. **19**: 2688-2691.
- Rask, T.S., Hansen, D.A., Theander, T.G., Gorm Pedersen, A. y Lavstsen, T. (2010). Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes--divide and conquer. *PLoS computational biology*. **6**.
- Ratner, A.J., Hippe, K.R., Aguilar, J.L., Bender, M.H., Nelson, A.L. y Weiser, J.N. (2006). Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *The Journal of biological chemistry*. **281**: 12994-12998.
- Reed, S.G., Orr, M.T. y Fox, C.B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature medicine*. **19**: 1597-1608.

- Ren, B., Li, J., Genschmer, K., Hollingshead, S.K. y Briles, D.E. (2012). The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci in vitro. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. **19**: 1574-1582.
- Ricci, S., Janulczyk, R., Gerlini, A., Braione, V., Colomba, L., Iannelli, F., Chiavolini, D., Oggioni, M.R., Bjorck, L. y Pozzi, G. (2011). The factor H-binding fragment of PspC as a vaccine antigen for the induction of protective humoral immunity against experimental pneumococcal sepsis. *Vaccine*. **29**: 8241-8249.
- Ricci, S., Janulczyk, R., Gerlini, A., Braione, V., Colomba, L., Iannelli, F., Chiavolini, D., Oggioni, M.R., Bjorck, L. y Pozzi, G. (2011). The factor H-binding fragment of PspC as a vaccine antigen for the induction of protective humoral immunity against experimental pneumococcal sepsis. *Vaccine*. **29**: 8241-8249.
- Rioux, S., Neyt, C., Di Paolo, E., Turpin, L., Charland, N., Labbe, S., Mortier, M.C., Mitchell, T.J., Feron, C., Martín, D. y Poolman, J.T. (2011). Transcriptional regulation, occurrence and putative role of the Pht family of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*. **157**: 336-348.
- Robbins, J.B., Austrian, R., Lee, C.J., Rastogi, S.C., Schiffman, G., Henrichsen, J., Makela, P.H., Broome, C.V., Facklam, R.R. y Tiesjema, R.H. (1983). Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *The Journal of infectious diseases*. **148**: 1136-1159.
- Roche, A.M., King, S.J. y Weiser, J.N. (2007). Live attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains induce serotype-independent mucosal and systemic protection in mice. *Infection and immunity*. **75**: 2469-2475.
- Rodríguez, A., Troye-Blomberg, M., Lindroth, K., Ivanyi, J., Singh, M. y Fernández, C. (2003). B- and T-cell responses to the mycobacterium surface antigen PstS-1 in the respiratory tract and adjacent tissues. Role of adjuvants and routes of immunization. *Vaccine*. **21**: 458-467.
- Rolo, D., Ardanuy, C., Fleites, A., Martín, R. y Liñares, J. (2009). Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) among prevalent clones in Spain. *BMC microbiology*. **9**: 80.
- Rosado, M.M., Gesualdo, F., Marcellini, V., Di Sabatino, A., Corazza, G.R., Smacchia, M.P., Nobili, B., Baronci, C., Russo, L., Rossi, F., Vito, R.D., Nicolosi, L., Inserra, A., Locatelli, F., Tozzi, A.E. y Carsetti, R. (2013). Preserved antibody levels and loss of memory B cells against pneumococcus and tetanus after splenectomy: tailoring better vaccination strategies. *European journal of immunology*. **43**: 2659-2670.
- Rosch, J.W., Gao, G., Ridout, G., Wang, Y.D. y Tuomanen, E.I. (2009). Role of the manganese efflux system mntE for signalling and pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*. **72**: 12-25.
- Sabag-Daigle, A., Blunk, H.M., Sengupta, A., Wu, J., Bogard, A.J., Ali, M.M., Stahl, C., Wysocki, V.H., Gopalan, V., Behrman, E.J. y Ahmer, B.M. (2016). A metabolic intermediate of the fructose-asparagine utilization pathway inhibits growth of a Salmonella fraB mutant. *Scientific reports*. **6**: 28117.
- Sambrook, J. (1989). Molecular Cloning. In A Laboratory Manual, C.S.H. Laboratory, ed. (NY: Cold Spring Harbor).
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sampson, J.S., Furlow, Z., Whitney, A.M., Williams, D., Facklam, R. y Carlone, G.M. (1997). Limited diversity of *Streptococcus pneumoniae* psaA among pneumococcal vaccine serotypes. *Infection and immunity*. **65**: 1967-1971.
- Sánchez, C.J., Kumar, N., Lizcano, A., Shivshankar, P., Dunning Hotopp, J.C., Jorgensen, J.H., Tettelin, H. y Orihuela, C.J. (2011). *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. *PloS one*. **6**: e28738.
- Sánchez, C.J., Shivshankar, P., Stol, K., Trakhtenbroit, S., Sullam, P.M., Sauer, K., Hermans, P.W. y Orihuela, C.J. (2010). The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS pathogens*. **6**: e1001044.
- Schenkein, J.G., Park, S. y Nahm, M.H. (2008). Pneumococcal vaccination in older adults induces antibodies with low opsonic capacity and reduced antibody potency. *Vaccine*. **26**: 5521-5526.
- Schneewind, O., Fowler, A. y Faull, K.F. (1995). Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science*. **268**: 103-106.
- Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D. y Model, P. (1993). Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *The EMBO journal*. **12**: 4803-4811.
- Seib, K.L., Zhao, X. y Rappuoli, R. (2012). Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **18 Suppl 5**: 109-116.

- Shah, P. y Swiatlo, E. (2006). Immunization with polyamine transport protein PotD protects mice against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **74**: 5888-5892.
- Shahinas, D., Tamber, G.S., Arya, G., Wong, A., Lau, R., Jamieson, F., Ma, J.H., Alexander, D.C., Low, D.E. y Pillai, D.R. (2011). Whole-genome sequence of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolate IS7493. *Journal of bacteriology*. **193**: 6102-6103.
- Shaper, M., Hollingshead, S.K., Benjamin, W.H., Jr. y Briles, D.E. (2004). PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infection and immunity*. **72**: 5031-5040.
- Shapiro, E.D., Berg, A.T., Austrian, R., Schroeder, D., Parcells, V., Margolis, A., Adair, R.K. y Clemens, J.D. (1991). The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *The New England journal of medicine*. **325**: 1453-1460.
- Sharif, O., Matt, U., Saluzzo, S., Lakovits, K., Haslinger, I., Furtner, T., Doninger, B. y Knapp, S. (2013). The scavenger receptor CD36 downmodulates the early inflammatory response while enhancing bacterial phagocytosis during pneumococcal pneumonia. *J Immunol*. **190**: 5640-5648.
- Simell, B., Auranen, K., Kayhty, H., Goldblatt, D., Dagan, R. y O'Brien, K.L. (2012). The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert review of vaccines*. **11**: 841-855.
- Soininen, A., Seppala, I., Nieminen, T., Eskola, J. y Kayhty, H. (1999). IgG subclass distribution of antibodies after vaccination of adults with pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*. **17**: 1889-1897.
- Stalhammar-Carlemalm, M., Waldemarsson, J., Johnsson, E., Areschoug, T. y Lindahl, G. (2007). Nonimmunodominant regions are effective as building blocks in a streptococcal fusion protein vaccine. *Cell host & microbe*. **2**: 427-434.
- Sternberg, G.M. (1881). A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl Board Health Bull*. **2**: 781-783.
- Suresh, M.V., Singh, S.K., Ferguson, D.A., Jr. y Agrawal, A. (2006). Role of the property of C-reactive protein to activate the classical pathway of complement in protecting mice from pneumococcal infection. *J Immunol*. **176**: 4369-4374.
- Surewaard, B.G., Trzcinski, K., Jacobino, S.R., Hansen, I.S., Vughs, M.M., Sanders, E.A., van der Ende, A., van Strijp, J.A. y de Haas, C.J. (2013). Pneumococcal immune evasion: ZmpC inhibits neutrophil influx. *Cellular microbiology*. **15**: 1753-1765.
- Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Analytical biochemistry*. **39**: 462-477.
- Szczesny, P. y Lupas, A. (2008). Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins--daTAA. *Bioinformatics*. **24**: 1251-1256.
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L.J. y von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. **45**: D362-D368.
- Tai, S.S., Lee, C.J. y Winter, R.E. (1993). Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **61**: 5401-5405.
- Tarragó, D., Fenoll, A., Sánchez-Tatay, D., Arroyo, L.A., Muñoz-Almagro, C., Esteva, C., Hausdorff, W.P., Casal, J. y Obando, I. (2008). Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **14**: 828-834.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K. y Fraser, C.M. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. **293**: 498-506.
- Thomas, J.C., Figueira, M., Fennie, K.P., Laufer, A.S., Kong, Y., Pichichero, M.E., Pelton, S.I. y Pettigrew, M.M. (2011). *Streptococcus pneumoniae* clonal complex 199: genetic diversity and tissue-specific virulence. *PloS one*. **6**: e18649.
- Tilley, S.J., Orlova, E.V., Gilbert, R.J., Andrew, P.W. y Saibil, H.R. (2005). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell*. **121**: 247-256.
- Tomasz, A. (1967). Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science*. **157**: 694-697.

- Tong, H.H., Li, D., Chen, S., Long, J.P. y DeMaria, T.F. (2005). Immunization with recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase NanA protects chinchillas against nasopharyngeal colonization. *Infection and immunity*. **73**: 7775-7778.
- Torres, A., Blasi, F., Peetermans, W.E., Viegi, G. y Welte, T. (2014). The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. **33**: 1065-1079.
- Torres, A., Bonanni, P., Hryniewicz, W., Moutschen, M., Reinert, R.R. y Welte, T. (2015). Pneumococcal vaccination: what have we learnt so far and what can we expect in the future? *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. **34**: 19-31.
- Tostes, R.O., Rodrigues, T.C., da Silva, J.B., Schanoski, A.S., Oliveira, M.L. y Miyaji, E.N. (2017). Protection Elicited by Nasal Immunization with Recombinant Pneumococcal Surface Protein A (rPspA) Adjuvanted with Whole-Cell Pertussis Vaccine (wP) against Co-Colonization of Mice with *Streptococcus pneumoniae*. *PloS one*. **12**: e0170157.
- Trihn, M., Ge, X., Dobson, A., Kitten, T., Munro, C.L. y Xu, P. (2013). Two-component system response regulators involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 in infective endocarditis. *PloS one*. **8**: e54320.
- Trolle, T. y Nielsen, M. (2014). NetTepi: an integrated method for the prediction of T cell epitopes. *Immunogenetics*. **66**: 449-456.
- Tseng, H.J., McEwan, A.G., Paton, J.C. y Jennings, M.P. (2002). Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infection and immunity*. **70**: 1635-1639.
- Tu, A.H., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E. y Szalai, A.J. (1999). Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **67**: 4720-4724.
- Uddin, S., Borrow, R., Haeney, M.R., Moran, A., Warrington, R., Balmer, P. y Arkwright, P.D. (2006). Total and serotype-specific pneumococcal antibody titres in children with normal and abnormal humoral immunity. *Vaccine*. **24**: 5637-5644.
- van der Linden, M., Reinert, R.R., Kern, W.V. y Imohl, M. (2013). Epidemiology of serotype 19A isolates from invasive pneumococcal disease in German children. *BMC infectious diseases*. **13**: 70.
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renaud, J.C., Eberl, G., Benecke, A.G., Trottein, F., Faveeuw, C. y Sirard, J.C. (2014). Activation of Type 3 innate lymphoid cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *The Journal of infectious diseases*. **210**: 493-503.
- Vengadesan, K. y Narayana, S.V. (2011). Structural biology of Gram-positive bacterial adhesins. *Protein science : a publication of the Protein Society*. **20**: 759-772.
- Voss, S., Hallstrom, T., Saleh, M., Burchhardt, G., Pribyl, T., Singh, B., Riesbeck, K., Zipfel, P.F. y Hammerschmidt, S. (2013). The choline-binding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin. *The Journal of biological chemistry*. **288**: 15614-15627.
- Voss, S., Hallstrom, T., Saleh, M., Burchhardt, G., Pribyl, T., Singh, B., Riesbeck, K., Zipfel, P.F. y Hammerschmidt, S. (2013). The choline-binding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin. *The Journal of biological chemistry*. **288**: 15614-15627.
- Walker, J.A., Allen, R.L., Falmagne, P., Johnson, M.K. y Boulnois, G.J. (1987). Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*. **55**: 1184-1189.
- Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine*. **344**: 1058-1066.
- Ware, D., Jiang, Y., Lin, W. y Swiatlo, E. (2006). Involvement of potD in *Streptococcus pneumoniae* polyamine transport and pathogenesis. *Infection and immunity*. **74**: 352-361.
- Weinberger, D.M., Harboe, Z.B., Sanders, E.A., Ndiritu, M., Klugman, K.P., Ruckinger, S., Dagan, R., Adegbola, R., Cutts, F., Johnson, H.L., O'Brien, K.L., Scott, J.A. y Lipsitch, M. (2010). Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. **51**: 692-699.
- Weinberger, D.M., Malley, R. y Lipsitch, M. (2011). Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*. **378**: 1962-1973.

- Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K. y Masure, H.R. (1994). Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infection and immunity*. **62**: 2582-2589.
- Welte, T., Torres, A. y Nathwani, D. (2012). Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*. **67**: 71-79.
- Werno, A.M. y Murdoch, D.R. (2008). Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. **46**: 926-932.
- WHO (2013). World Health Organization. Global Vaccine Action Plan 2011–2020.
- WHO (2007). Pneumococcal disease. <http://www.who.int/ith/diseases/pneumococcal/en/>
- Wilson, R., Cohen, J.M., Reglinski, M., Jose, R.J., Chan, W.Y., Marshall, H., de Vogel, C., Gordon, S., Goldblatt, D., Petersen, F.C., Baxendale, H. y Brown, J.S. (2017). Naturally Acquired Human Immunity to Pneumococcus Is Dependent on Antibody to Protein Antigens. *PLoS pathogens*. **13**: e1006137.
- Witzenrath, M., Gutbier, B., Hocke, A.C., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Berger, K., Mitchell, T.J., de los Toyos, J.R., Rosseau, S., Suttorp, N. y Schutte, H. (2006). Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Critical care medicine*. **34**: 1947-1954.
- Wootton, J.C. (1994). Non-globular domains in protein sequences: automated segmentation using complexity measures. *Computers & chemistry*. **18**: 269-285.
- Wu, K., Yao, R., Wang, H., Pang, D., Liu, Y., Xu, H., Zhang, S., Zhang, X. y Yin, Y. (2014). Mucosal and systemic immunization with a novel attenuated pneumococcal vaccine candidate confer serotype independent protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Vaccine*. **32**: 4179-4188.
- Wyres, K.L., Lambertsen, L.M., Croucher, N.J., McGee, L., von Gottberg, A., Liñares, J., Jacobs, M.R., Kristinsson, K.G., Beall, B.W., Klugman, K.P., Parkhill, J., Hakenbeck, R., Bentley, S.D. y Brueggemann, A.B. (2013). Pneumococcal capsular switching: a historical perspective. *The Journal of infectious diseases*. **207**: 439-449.
- Xu, G., Kiefel, M.J., Wilson, J.C., Andrew, P.W., Oggioni, M.R. y Taylor, G.L. (2011). Three *Streptococcus pneumoniae* sialidases: three different products. *Journal of the American Chemical Society*. **133**: 1718-1721.
- Yao, B., Zhang, L., Liang, S. y Zhang, C. (2012). SVMTriP: a method to predict antigenic epitopes using support vector machine to integrate tri-peptide similarity and propensity. *PloS one*. **7**: e45152.
- Yother, J. y Briles, D.E. (1992). Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *Journal of bacteriology*. **174**: 601-609.
- Yuste, J., Botto, M., Paton, J.C., Holden, D.W. y Brown, J.S. (2005). Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol*. **175**: 1813-1819.
- Yuste, J., Jado, I., Gimenez, M.J., Aguilar, L., Molero, F., Fenoll, A. y Casal, J. (2002). Modification of bacteraemia by specific antibodies and relation with mortality in a pneumococcal mouse sepsis model. *Clinical and experimental immunology*. **128**: 411-415.
- Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jonsson, G., Tay, L.S., Hyams, C., Baxendale, H.E., Goldblatt, F., Botto, M. y Brown, J.S. (2008). Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infection and immunity*. **76**: 3761-3770.
- Zhang, J.R., Mostov, K.E., Lamm, M.E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M. y Tuomanen, E. (2000). The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell*. **102**: 827-837.
- Zhang, Z., Clarke, T.B. y Weiser, J.N. (2009). Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J Clin Invest*. **119**: 1899-1909.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. y Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*. **7**: 203-214.

ANEXO

Publicaciones derivadas, hasta la fecha, de los resultados presentados en esta Tesis

Escolano-Martinez, M.S., Domenech, A., Yuste, J., Cercenado, M.I., Ardanuy, C., Liñares, J., de la Campa, A. G. y Martín-Galiano, A.J. (2016). DiiA is a novel dimorphic cell wall protein of *Streptococcus pneumoniae* involved in invasive disease. *Journal Infection* **73**: 71-81.

